

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À MONTRÉAL

**LES FLAVONOÏDES D'ORIGINE ALIMENTAIRE ET LE CANCER**  
INHIBITION DE L'ANGIOGENÈSE TUMORALE  
ET DU POTENTIEL INVASIF DES MÉDULLOBLASTOMES

MÉMOIRE  
PRÉSENTÉ  
COMME EXIGENCE PARTIELLE  
DE LA MAÎTRISE EN CHIMIE

PAR  
DAVID LABBÉ

DÉCEMBRE 2008

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À MONTRÉAL  
Service des bibliothèques

Avertissement

La diffusion de ce mémoire se fait dans le respect des droits de son auteur, qui a signé le formulaire *Autorisation de reproduire et de diffuser un travail de recherche de cycles supérieurs* (SDU-522 – Rév.01-2006). Cette autorisation stipule que «conformément à l'article 11 du Règlement no 8 des études de cycles supérieurs, [l'auteur] concède à l'Université du Québec à Montréal une licence non exclusive d'utilisation et de publication de la totalité ou d'une partie importante de [son] travail de recherche pour des fins pédagogiques et non commerciales. Plus précisément, [l'auteur] autorise l'Université du Québec à Montréal à reproduire, diffuser, prêter, distribuer ou vendre des copies de [son] travail de recherche à des fins non commerciales sur quelque support que ce soit, y compris l'Internet. Cette licence et cette autorisation n'entraînent pas une renonciation de [la] part [de l'auteur] à [ses] droits moraux ni à [ses] droits de propriété intellectuelle. Sauf entente contraire, [l'auteur] conserve la liberté de diffuser et de commercialiser ou non ce travail dont [il] possède un exemplaire.»

## REMERCIEMENTS

Mes remerciements vont tout d'abord à mon directeur de recherche, le D<sup>r</sup> Richard Béliveau, pour m'avoir donné la chance d'effectuer des recherches au sein de son laboratoire sur un sujet qui me tient à cœur : la prévention du cancer par les aliments. Sa rigueur scientifique, son enthousiasme pour l'avancement de la science et son sens de l'humour ont été pour moi source d'inspiration. Je remercie la D<sup>re</sup> Sylvie Lamy pour son soutien et son encadrement à mes tout débuts en recherche sur le cancer. J'adresse mes sincères remerciements au D<sup>r</sup> Denis Gingras et au D<sup>r</sup> Dominique Boivin pour avoir pris le relais dans ma formation en recherche. Leur sens critique hors pair et leur patience ont été des éléments clés de mon développement en tant que futur chercheur. Je tiens aussi à les remercier pour leur amitié et leur sens de l'humour qui m'a déridé lors des journées de travail. Merci également à la D<sup>re</sup> Édith Beaulieu pour son aide quotidienne.

Un merci tout particulier à mon ami Mathieu Provençal. Son soutien moral et technique, jour après jour, m'a permis de passer plus facilement au travers de ma maîtrise. Merci également à Ryan Veitch qui a égayé les étés au laboratoire. Je tiens à remercier mes amis et collègues du Laboratoire de médecine moléculaire pour les bons moments que nous avons partagés, plus particulièrement merci à Valérie Bédard, Marisol Michaud, Xavier Vanier, Carine Nyalendo et Nicolas Fontaine.

Je souhaite remercier mes parents, Jocelyn et Diane, qui m'ont toujours encouragé et appuyé dans la poursuite de mes études. Un gros merci à ma conjointe Judith qui m'a soutenu moralement tout au long de ma maîtrise et au cours des nombreux soirs et fins de semaine passés à travailler.

Finalement, je souhaite remercier le Conseil de recherche en sciences naturelles et en génie du Canada (CRSNG) et le Fonds québécois de la recherche sur la nature et les technologies (FQRNT) pour leur soutien financier.

## NOMS DU DIRECTEUR DE MAÎTRISE ET DES MEMBRES DU JURY

Directeur de maîtrise : **Richard Béliveau**, Ph.D.

Professeur

Laboratoire de médecine moléculaire

Département de chimie, Université du Québec à Montréal

Centre de cancérologie Charles-Bruneau, Hôpital Sainte-Justine

Membres du jury : **Luc Vallières**, Ph.D.

Professeur

Département d'anatomie et de physiologie, Université Laval

Centre de recherche en endocrinologie moléculaire et oncologique,

Centre hospitalier de l'Université Laval (CHUL)

**Borhane Annabi**, Ph.D.

Professeur

Chaire de recherche du Canada en oncologie moléculaire

Département de chimie, Université du Québec à Montréal

## TABLE DES MATIÈRES

	Page
LISTE DES FIGURES	viii
LISTE DES ABRÉVIATIONS, DES SIGLES ET DES ACRONYMES	x
RÉSUMÉ	xii
CHAPITRE I	
INTRODUCTION	1
1.1 Les médulloblastomes	2
1.2 L'angiogenèse tumorale	3
1.2.1 Le récepteur à tyrosine kinase VEGFR-2	6
1.2.2 Le récepteur à tyrosine kinase PDGFR- $\beta$	8
1.2.3 Les thérapies antiangiogéniques	9
1.2.4 Les thérapies antiangiogéniques et les médulloblastomes	12
1.3 La formation de métastases	13
1.3.1 Les récepteurs à tyrosine kinase ERBB	15
1.3.2 Le récepteur à tyrosine kinase Met	16
1.3.3 Les thérapies antimétastatiques	18
1.3.4 Les thérapies antimétastatiques et les médulloblastomes	20
1.4 La vision Darwinienne du cancer	22
1.5 Lien alimentation/cancer	23
1.6 La nutrathérapie	24
1.7 Les flavonoïdes	26
1.7.1 Les anthocyanes	28
1.7.2 Les flavonols	29
1.8 Les objectifs de la recherche	30
CHAPITRE II	
DELPHINIDIN, A DIETARY ANTHOCYANIDIN, INHIBITS PLATELET DERIVED GROWTH	33
FACTOR LIGAND/RECEPTOR (PDGF/PDGFR) SIGNALING	
2.1 Introduction	35

2.2	Materials and methods	38
2.2.1	Materials	38
2.2.2	Cell culture	39
2.2.3	Immunoprecipitation and immunoblotting procedures	39
2.2.4	Analysis of ERK-1/2 phosphorylation	40
2.2.5	Migration assays	40
2.2.6	Cell proliferation assays	41
2.2.7	Assessment of cell viability	41
2.2.8	Capillary tube formation by EC/SMC in fibrin gels	41
2.2.9	Capillary tube stabilization by EC/SMC in fibrin gels	42
2.2.10	Animals	42
2.2.11	In vivo Matrigel plug assay	43
2.2.12	NCI-H460 tumor xenograft model	43
2.2.13	Statistical analysis	43
2.3	Results	45
2.3.1	Delphinidin inhibits PDGF-induced tyrosine phosphorylation of PDGFR- $\beta$	45
2.3.2	Delphinidin inhibits PDGF-induced ERK phosphorylation	45
2.3.3	Delphinidin inhibits PDGF-induced migration of smooth muscle cells	46
2.3.4	Delphinidin inhibits growth factor-induced tube formation in 3D fibrin gels	46
2.3.5	Anthocyan-rich extract inhibits FGF-2 and PDGF-BB-induced angiogenesis in vivo	48
2.3.6	Anthocyan-rich extract inhibits human tumor growth	49
2.4	Discussion	50
CHAPITRE III		
THE FLAVONOLS QUERCETIN, KAEMPFEROL AND MYRICETIN INHIBIT HEPATOCYTE GROWTH FACTOR-INDUCED MEDULLOBLASTOMA CELL MIGRATION		63
3.1	Introduction	65
3.2	Materials and methods	67

3.2.1	Materials	67
3.2.2	Cell culture	67
3.2.3	Immunoblotting procedures	67
3.2.4	Migration assays	68
3.2.5	Fluorescence and confocal microscopy	68
3.2.6	Cell adhesion assays	69
3.2.7	Statistical analysis	69
3.3	Results	70
3.3.1	Quercetin, myricetin and kaempferol inhibit Met phosphorylation induced by HGF in DAOY	70
3.3.2	Low concentrations of quercetin and kaempferol inhibit Akt phosphorylation induced by HGF in DAOY	70
3.3.3	Myricetin, kaempferol and quercetin inhibit HGF mediated DAOY cell migration	71
3.3.4	Treatment with the flavonols kaempferol, quercetin and myricetin or with the Met kinase inhibitor SU11274 prevents morphological changes induced by HGF in DAOY	72
3.4	Discussion	73
CHAPITRE IV		
DISCUSSION		86
4.1	Efficacité relative des flavonoïdes en comparaison avec des inhibiteurs spécifiques	86
4.2	Mécanismes d'action probables des flavonoïdes sur les récepteurs PDGFR- $\beta$ et Met	89
4.3	Biodisponibilité	90
4.4	Le passage de la barrière hémato-encéphalique	92
4.5	Relevance physiologique	93
4.6	Approche multi-inhibitrice dans la prévention et le traitement du cancer	94
CHAPITRE V		
CONCLUSION ET PROSPECTIVES		97
RÉFÉRENCES		99

## APPENDICE A

## CONTRIBUTION DE L'AUTEUR DU MÉMOIRE

134



## LISTE DES FIGURES

Figure	Page
1.1 Balance de différentes molécules proangiogéniques et antiangiogéniques régulant la « switch angiogénique »	6
1.2 Stabilisation du réseau de cellules endothéliales par les cellules musculaires lisses	9
1.3 Sensibilisation des cellules endothéliales suite à un traitement contre PDGFR- $\beta$	11
1.4 Schéma décrivant la formation de métastases	14
1.5 Schéma de la cascade de signalisation classique de Met	17
1.6 Structure de base des flavonoïdes	27
1.7 Structure des principaux anthocyanes	28
1.8 Structure des principaux flavonols	29
2.1 Effect of delphinidin on phosphorylation of VEGFR-2 and PDGFR- $\beta$	57
2.2 Effect of delphinidin on phosphorylation of ERK-1/2 induced by PDGF-BB in PASMC	58
2.3 Effect of delphinidin on PDGF-BB-induced proliferation and migration of smooth muscle cells	59
2.4 Effect of delphinidin on growth factor-induced tube formation and stabilization of HUVEC/PASMC in 3D fibrin gels	60
2.5 Effect of berry extracts on synergistic angiogenesis <i>in vivo</i> induced by FGF-2 and PDGF-BB	61
2.6 Effect of berry extract feeding on NCI-H460 tumor xenograft growth in athymic nude mice	62
3.1 Structure of flavonols and of the green tea flavanol (-)-epigallocatechin gallate (EGCG).	80
3.2 Quercetin, myricetin and kaempferol inhibit Met phosphorylation induced by HGF in DAOY	81
3.3 Quercetin and kaempferol inhibit Akt phosphorylation induced by HGF in DAOY	82
3.4 Flavonols myricetin, kaempferol and quercetin inhibit HGF-mediated DAOY cell migration	83

3.5	Kaempferol, quercetin and myricetin prevent morphological changes induced by HGF in DAOY	84
Sup. 3.1	Flavonols does not affect ERK phosphorylation induced by HGF in DAOY	75

## LISTE DES ABRÉVIATIONS, DES SIGLES ET DES ACRONYMES

<b>ATP</b>	adenosine triphosphate – adénosine triphosphate
<b>BBB</b>	blood-brain barrier – barrière hémato-encéphalique
<b>Cy</b>	cyanidin – cyanidine
<b>DAOY</b>	medulloblastoma cell line – ligné cellulaire de médulloblastome
<b>Dp</b>	delphinidin – delphinidine
<b>EC</b>	endothelial cell – cellule endothéliale
<b>ECG</b>	(-)-epicatechin gallate – (-)-épicatéchine gallate
<b>EGCG</b>	(-)-epigallocatechin gallate – (-)-épigallocatéchine gallate
<b>EGFR</b>	epidermal growth factor receptor – récepteur / facteur de croissance épidermique
<b>ERBB-1</b>	epidermal growth factor receptor 1 – récepteur 1 / facteur de croissance épidermique
<b>ERBB-2</b>	epidermal growth factor receptor 2 – récepteur 2 / facteur de croissance épidermique
<b>ERK</b>	extracellular signal-regulated kinase – kinase régulée par un signal extracellulaire
<b>FGF-2</b>	fibroblast growth factor-2 – facteur de croissance fibroblastique de type 2
<b>FITC</b>	fluorescein isothiocyanate – fluorescéine isothiocyanate
<b>HGF</b>	hepatocyte growth factor – facteur de croissance des hépatocytes
<b>HUVEC</b>	human umbilical vein endothelial cell – cellules endothéliales de la veine ombilicale
<b>IGFR-1</b>	insulin-like growth factor receptor I – récepteur 1 / facteur de croissance analogue à l'insuline
<b>PASMC</b>	human pulmonary aortic smooth muscle cell – cellules musculaires lisses aortiques du poumon humain
<b>PDGF</b>	platelet-derived growth factor – facteur de croissance dérivé des plaquettes
<b>PDGFR</b>	platelet-derived growth factor receptor – récepteur / PDGF
<b>PDGFR-<math>\beta</math></b>	platelet-derived growth factor $\beta$ -receptor – récepteur / PDGF bêta
<b>Pg</b>	pelargonidin – pélargonidine

<b>PI3K</b>	phosphatidylinositol-3-kinase – 1-phosphatidylinositol 3-kinase
<b>PLGF</b>	placenta growth factor – facteur de croissance placentaire
<b>Pt</b>	petunidin – pétunidine
<b>RTK</b>	tyrosine kinase receptors – récepteur à tyrosine kinase
<b>SK-Br3</b>	human breast adenocarcinoma cells – cellules humaines d'un adénocarcinome du sein
<b>VEGF</b>	vascular endothelial growth factor – facteur de croissance endothéliale vasculaire
<b>VEGFR-2</b>	vascular endothelial growth factor receptor-2 – récepteur 2 / VEGF
<b>VPF</b>	vascular permeability factor – facteur de perméabilité vasculaire
<b>TGF-<math>\alpha</math></b>	transforming growth factor alpha – facteur de croissance transformant alpha

## RÉSUMÉ

Le médulloblastome est la tumeur maligne du cerveau la plus répandue chez l'enfant. C'est un cancer très agressif, avec près de 30 % des enfants qui présentent des métastases lors du diagnostic initial. En réponse à divers signaux, les cellules cancéreuses s'échappent de la tumeur primaire et empruntent généralement les nombreux vaisseaux sanguins immatures issus de l'angiogenèse tumorale afin de se disséminer dans l'organisme. Les récepteurs à tyrosine kinase sont responsables de la majorité des signaux cellulaires cruciaux dans les processus d'angiogenèse tumorale et de formation de métastases. Dans un contexte de prévention et de traitement du cancer par l'alimentation, ces derniers représentent des cibles de choix pour de nombreuses molécules issues de la diète telles que certains flavonoïdes.

La croissance de la plupart des cancers, incluant les cancers cérébraux, dépend d'une vascularisation adéquate et l'inhibition de l'angiogenèse tumorale pourrait être une stratégie efficace afin de bloquer ou retarder la croissance tumorale. Récemment, les approches antiangiogéniques se sont diversifiées afin de viser non seulement les cellules endothéliales, mais également les cellules musculaires lisses qui contribuent à la maturation et à la stabilisation des vaisseaux sanguins. Nous avons démontré précédemment que la delphinidine, un constituant actif majeur des baies, inhibe la phosphorylation du « vascular endothelial growth factor (VEGF) receptor-2 » ou VEGFR-2 induite par le VEGF et bloque l'angiogenèse *in vitro* et *in vivo*. Dans cette étude, nous démontrons que la delphinidine inhibe également l'activation du « platelet derived growth factor-BB (PDGF-BB) receptor- $\beta$  » ou PDGFR- $\beta$  dans les cellules musculaires lisses et que cette inhibition contribuerait à l'effet antitumoral de cette molécule. L'effet inhibiteur de la delphinidine sur PDGFR- $\beta$  est très rapide et mène à l'inhibition de l'activation de ERK-1/2 et de la motilité des cellules musculaires lisses induite par le PDGF-BB. De plus, la delphinidine empêche la différenciation et la stabilisation des cellules endothéliales et des cellules musculaires lisses en un réseau de tubes similaires à des capillaires dans un modèle de coculture en trois dimensions. Dans un modèle d'implant de Matrigel chez la souris, nous avons démontré qu'un extrait de baies riche en anthocyanes est en mesure d'inhiber la formation synergique de vaisseaux sanguins par le « fibroblast growth factor-2 » ou FGF-2 et le PDGF-BB. Le gavage de souris nues avec ce même extrait a également retardé de manière significative la croissance tumorale dans un modèle de xénogreffe de cancer du poumon. Ensemble, ces résultats permettent de mieux comprendre les mécanismes responsables de l'activité antiangiogénique de la delphinidine, procurant des informations importantes dans le développement de stratégies efficaces de prévention du cancer par l'alimentation.

Récemment, le « hepatocyte growth factor » ou HGF et son récepteur à tyrosine kinase Met, se sont imposés comme des éléments clés de la croissance et de la propension à former des métastases dans les médulloblastomes chez l'humain, suggérant que l'inhibition de cette voie de signalisation pourrait être une cible intéressante dans la prévention et le traitement de cette maladie. Au cours de cette étude, nous avons démontré que différents flavonols d'origine alimentaire, soit la quercétine, le kaempferol et la myricétine, inhibent l'axe de signalisation HGF/Met dans une lignée de cellules de médulloblastomes (DAOY).

Cet effet prévient la formation de sites riches en actine corticale à la membrane et résulte en l'inhibition de la migration cellulaire induite par Met. De plus, la quercétine et le kaempferol diminuent fortement l'activation de Akt induite par le HGF et ce, à des concentrations pouvant être atteintes par l'alimentation. Ces résultats indiquent que la quercétine, le kaempferol et la myricétine sont des inhibiteurs de l'activité de Met issus de l'alimentation, ce qui suggère que cet effet inhibiteur pourrait contribuer aux propriétés chimiopréventives de ces molécules.

Mots-clés : cancer, alimentation, prévention, angiogenèse, médulloblastomes, flavonoïdes.

## **CHAPITRE I**

### **INTRODUCTION**

Le cancer est sans contredit l'un des principaux fléaux de ce siècle. Chaque année, près de 10 millions de nouveaux cas sont diagnostiqués à travers le monde (Greaves, 2007). Au Canada, quelques 166 400 cas sont estimés pour l'année 2008, selon la Société canadienne du cancer. Malgré les sommes faramineuses investies dans la lutte au cancer, encore aujourd'hui près de 40 % des Canadiennes et 45 % des Canadiens risquent d'en être atteints au cours de leur vie, et 1 personne sur 4 en mourra.

Maladie d'une complexité extraordinaire, le terme général « cancer » regroupe en fait plus de 100 différents types de maladies, chacune de celles-ci comprenant plusieurs variantes (Hanahan et Weinberg, 2000). Malgré cette grande diversité, les chercheurs s'accordent pour dire que le processus de cancérogenèse s'effectue selon un mécanisme analogue à l'évolution darwinienne. Ce mécanisme se résume en une succession de changements génétiques, chacun conférant certains avantages du point de vue de la croissance cellulaire, changements menant à la conversion progressive des cellules humaines normales en cellules cancéreuses (Nowell, 1976). Traditionnellement, on divise le processus de cancérogenèse en trois phases cruciales, soit : l'initiation, la promotion et la progression, chacune des phases pouvant être d'une durée variable (Surh, 2003).

L'initiation est généralement un processus rapide et irréversible, qui implique des dommages génotoxiques suite à la détérioration de l'ADN cellulaire par des agents cancérogènes. Si les dommages à l'ADN cellulaire ne sont pas suffisamment sévères pour entraîner la mort de la cellule, ou si les mécanismes d'autodestruction ont été altérés, la cellule entre alors dans la phase de promotion (Hussain, Hofseth et Harris, 2003). Cette phase est considérée comme étant un processus relativement long et réversible, pendant lequel les altérations cellulaires s'accumulent, transformant petit à petit les cellules saines en cellules

précancéreuses. Lors de cette étape, les cellules doivent acquérir quatre altérations essentielles avant d'atteindre la dernière phase de la transformation néoplasique. Ces altérations sont : l'autosuffisance en facteurs de croissance, l'insensibilité aux antifacteurs de croissance, l'évasion de la mort programmée de la cellule (apoptose) et l'acquisition d'un potentiel de réplication illimité. Finalement, lors de la phase de progression, les cellules doivent contracter deux nouveaux traits essentiels à tout cancer malin, soit l'acquisition d'une angiogenèse tumorale soutenue et la capacité de procéder à l'invasion des tissus et à la formation de métastases (Hanahan et Weinberg, 2000). Si ces six altérations clés confèrent un avantage compétitif aux cellules cancéreuses, elles représentent autant de cibles stratégiques dans la lutte contre ce désordre. Cependant, à l'heure actuelle les thérapies antiangiogéniques et antimétastatiques sont plus prometteuses, puisque c'est généralement à la suite de l'enclenchement de ces deux étapes clés que le cancer est diagnostiqué et traité (Naumov, Akslen et Folkman, 2006).

### 1.1 Les médulloblastomes

Les tumeurs du système nerveux central représentent le second cancer pédiatrique en importance, après les leucémies. Elles affectent près de 3,3 enfants sur 100 000 (Legler *et al.*, 1999) et sont associées à 20 % des nouveaux cas et à 30 % des décès imputables au cancer chez les jeunes de moins de 14 ans au Canada, selon la Société canadienne du cancer. Le médulloblastome est la tumeur cérébrale la plus répandue chez l'enfant (Marino, 2005 ; Polkinghorn et Tarbell, 2007) et est responsable de près de 40 % des tumeurs pédiatriques du cervelet (Crawford, MacDonald et Packer, 2007). Pour fins cliniques, les médulloblastomes sont généralement divisés en cinq groupes sur la base de critères histologiques, soit : classique, desmoplastique, anaplastique ou à grandes cellules, mélanotique et médullomyoblastome, ces deux derniers groupes étant des sous-types extrêmement rares (Crawford, MacDonald et Packer, 2007).

Une grande percée dans la compréhension des médulloblastomes a été rendue possible par l'identification de deux syndromes génétiques prédisposant au développement de



ce cancer. Les syndromes de Gorlin et celui de la polypose adénomateuse sont causés par une mutation des gènes PTCH et APC respectivement, tous deux associés à la formation de médulloblastomes. Certes, cette percée a permis d'enrichir nos connaissances (Collins, 2004), mais elle n'a pas donné les résultats cliniques escomptés puisque ces gènes ne contribuent qu'à moins de 15 % des médulloblastomes sporadiques (Dahmen *et al.*, 2001 ; Koch *et al.*, 2001).

En effet, malgré de meilleures connaissances sur cette maladie, l'efficacité des traitements demeure relativement faible, résultant en un taux de survie sans récurrence après 5 ans variant entre 50 % et 60 % (Rossi *et al.*, 2008). En outre, la sévérité du traitement combiné aux effets neurologiques de la tumeur augmente considérablement le risque de développer des séquelles à long terme, dont une puberté précoce, un mauvais développement de la colonne vertébrale, des effets dévastateurs sur les capacités cognitives ainsi que des déficiences hormonales entraînant de graves troubles de la croissance (Gilbertson, 2004). Le médulloblastome est un cancer hautement métastatique où près de 30 % des enfants présentent déjà des métastases lors du diagnostic (Crawford, MacDonald et Packer, 2007). De plus, malgré l'irradiation complète du cerveau et de la colonne vertébrale afin de prévenir la dissémination de la maladie, près de la moitié des patients meurent suite à une récurrence précoce (Rossi *et al.*, 2008). Une forte densité des vaisseaux sanguins étant synonyme d'un pronostic défavorable significatif (Ozer *et al.*, 2004), il est rationnel de poser l'hypothèse que l'importante propension de la maladie à métastaser est attribuable, entre autres, à une angiogenèse tumorale substantielle (Grizzi, Weber et Di Ieva, 2008).

## 1.2 L'angiogenèse tumorale

Chez les animaux primitifs, tels le ver *Caenorhabditis elegans* et la mouche à fruit *Drosophila melanogaster*, le corps minuscule de ces bestioles permet à l'oxygène de diffuser au travers de l'organisme et d'atteindre toutes les cellules. Cependant, chez les autres espèces de plus grande taille qui se sont développées ultérieurement, l'évolution les a dotées d'un système vasculaire permettant la distribution de l'oxygène aux cellules éloignées par

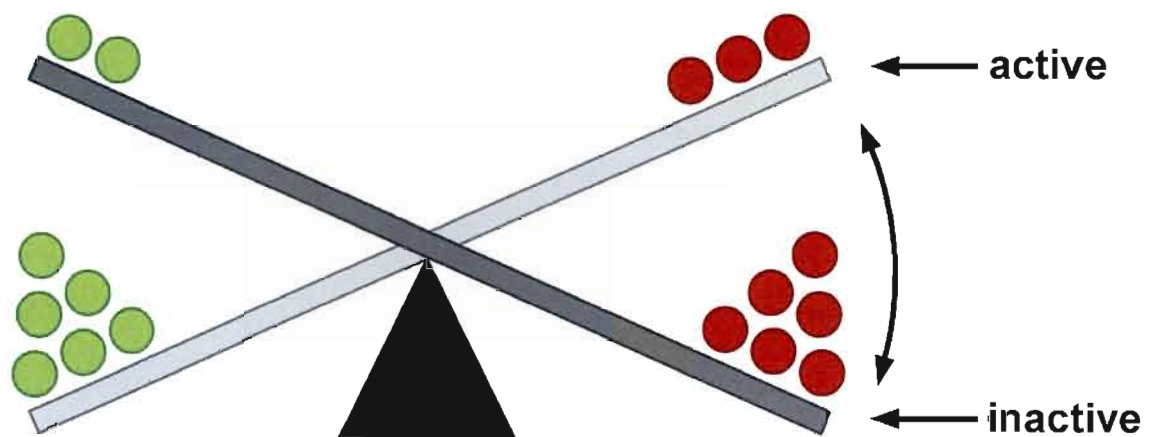
l'intermédiaire du sang (Carmeliet, 2005). La formation de ce système vasculaire *de novo* chez l'embryon par les cellules endothéliales progénitrices (angioblastes) est nommée vasculogenèse (Carmeliet, 2003) et est une étape cruciale du développement fœtal. Ce système permet non seulement l'apport en nutriments et en oxygène aux cellules, mais il fournit également les instructions nécessaires pour favoriser la morphogenèse des organes. À cette étape, l'assemblage de cellules endothéliales progénitrices résulte en un labyrinthe vasculaire primitif constitué d'un réseau de petits capillaires, où chacun est déjà destiné à assumer un rôle artériel ou veineux (Coultas, Chawengsaksophak et Rossant, 2005).

L'angiogenèse, soit la formation de vaisseaux sanguins à partir de capillaires préexistants, fait suite à l'étape de vasculogenèse. Lors de cette étape, le réseau vasculaire s'étend et se remodèle en un ensemble hautement organisé, où les vaisseaux plus gros se divisent en plus petits (Folkman, 1995). S'ensuit l'étape de l'artériogenèse, où péricytes et cellules musculaires lisses sont recrutés par les cellules endothéliales et recouvrent ces dernières, fournissant la résistance nécessaire pour supporter la pression sanguine et permettant de réguler la perfusion sanguine. Après la naissance, l'angiogenèse contribue encore à la croissance des différents organes, mais à l'âge adulte, la majorité des vaisseaux sanguins demeurent quiescents. Normalement, ce n'est que lors du cycle menstruel et du développement du placenta chez la femme enceinte, ou encore lors du processus de guérison des blessures, que l'angiogenèse est réactivée chez l'adulte (Carmeliet, 2005).

C'est en 1971 qu'un rapprochement entre l'angiogenèse et le cancer a été fait pour la première fois. L'hypothèse formulée par Judah Folkman suggérait que la croissance tumorale est dépendante de l'angiogenèse (Folkman, 1971). Contrairement à ses prédécesseurs, qui suggéraient qu'une prolifération cellulaire excessive était suffisante pour mener à l'émergence d'une tumeur assez grosse pour tuer son hôte, Folkman proposa que cette prolifération cellulaire doit être couplée à une angiogenèse tumorale soutenue afin d'être maligne (Folkman, 2006). En effet, malgré l'acquisition d'un potentiel de réplication illimité par les cellules d'une tumeur cancéreuse, la croissance de cette dernière devient vite limitée par son approvisionnement en nutriments et en oxygène. Ainsi, la plupart des adultes recèlent des tumeurs *in situ* microscopiques situés dans plus d'un organe (Black et Welch, 1993). Ces

cancers non angiogéniques d'environ  $1 \text{ mm}^3$  demeurent à l'état quiescent puisqu'ils sont limités par une vascularisation inadéquate (Naumov, Akslen et Folkman, 2006). Cependant, près d'une tumeur sur 600 parvient à passer cette barrière au développement tumoral et à détourner le réseau d'irrigation du corps humain à son compte (Folkman et Kalluri, 2004). Bien que certaines tumeurs telles les glioblastomes exploitent initialement la vascularisation cérébrale existante pour progresser, processus appelé cooption vasculaire, celles-ci finissent ultimement par être abreuvée par une angiogenèse soutenue (Holash *et al.*, 1999). Cette étape cruciale est documentée comme étant la « switch angiogénique » (Bergers et Benjamin, 2003).

Lors des processus physiologiques normaux, l'angiogenèse est finement régulée par une balance adéquate de signaux proangiogéniques et antiangiogéniques. Ces signaux, orchestrés par une variété de molécules activatrices et inhibitrices (Figure 1.1), permettent la maturation et la stabilisation rapide des nouveaux vaisseaux sanguins (Bergers et Benjamin, 2003). Le débalancement de cette « switch angiogénique » est reconnu pour causer plus de 70 désordres de santé. Ainsi, une angiogenèse soutenue cause ou caractérise des maladies telles le diabète, l'obésité, le psoriasis ou encore l'arthrite, tandis qu'une angiogenèse insuffisante caractérise des maladies comme l'Alzheimer, l'hypertension ou la maladie de Crohn (Carmeliet, 2005). Dans le cas d'un cancer malin, une balance en faveur d'une angiogenèse soutenue entraîne la vascularisation de la tumeur. Cependant, puisqu'il y a un débalancement énorme entre les signaux proangiogéniques et antiangiogéniques, l'architecture vasculaire tumorale diffère de sa contrepartie normale par son irrégularité, sa forme, son manque d'étanchéité et ses nombreux culs-de-sac. La vascularisation tumorale est en fait dysfonctionnelle et on décrit les tumeurs comme des blessures qui ne guérissent jamais (Bergers et Benjamin, 2003). Parmi les acteurs détenant un rôle crucial dans ce processus d'angiogenèse tumorale, nous retrouvons les récepteurs à tyrosine kinase VEGFR-2 et PDGFR- $\beta$ .



● <b>Activateurs</b>	● <b>Inhibiteurs</b>
<b>VEGF-A</b>	<b>thrombospondine-1,-2</b>
<b>VEGF-B,-C</b>	<b>interféron <math>\alpha/\beta</math></b>
<b>FGF1 (aFGF)</b>	<b>angiostatine</b>
<b>FGF2 (bFGF)</b>	<b>endostatine</b>
<b>autres FGFs</b>	<b>collagène IV (fragments)</b>
<b>etc.</b>	<b>etc.</b>

Figure 1.1 : Balance de différentes molécules proangiogéniques et antiangiogéniques régulant la « switch angiogénique ». Adapté de (Weinberg, 2007).

### 1.2.1 Le récepteur à tyrosine kinase VEGFR-2

Bien que les cancers produisent une large gamme de protéines angiogéniques (Relf *et al.*, 1997), la famille du « vascular endothelial growth factor » ou VEGF (également connu sous le nom « vascular permeability factor » ou VPF) est particulièrement importante (Shibuya et Claesson-Welsh, 2006). De tous les types de cancers chez l'humain, environ 60 % d'entre eux expriment ces protéines (Folkman, 2006). La famille de facteurs de croissance réunis sous le terme VEGF, regroupe plusieurs protéines reconnues comme étant

essentielles lors des processus de vasculogenèse, d'angiogenèse et de lymphangiogenèse, autant physiologiques que pathologiques (Dvorak, 2005). Chez les mammifères, cette famille comprend cinq membres, soit : le VEGFA, B, C, D et le « placenta growth factor » ou PLGF. Ces facteurs de croissance se lient selon différentes affinités aux trois récepteurs à tyrosine kinase VEGFR-1, -2 et -3, récepteurs pouvant former une combinaison d'homodimères et d'hétérodimères. Malgré leur lien de parenté, ces récepteurs régulent différents signaux (Olsson *et al.*, 2006). Ainsi, le VEGFR-1 est un important régulateur de la migration des monocytes et des macrophages (Sawano *et al.*, 2001), le VEGFR-3 est un acteur important du développement et de la fonctionnalité du réseau lymphatique (Alitalo, Tammela et Petrova, 2005), tandis que le VEGFR-2 est impliqué dans tous les aspects liés à la biologie des cellules endothéliales vasculaires (Ferrara, 2004). Lors de l'angiogenèse, c'est le facteur de croissance VEGFA, un homodimère comprenant deux chaînes de 165 acides aminés organisées de façon antiparallèle et stabilisées par des liaisons disulfures intr chaîne et inter chaîne avec huit résidus cystéines (Olsson *et al.*, 2006), et son récepteur le VEGFR-2, qui prédominent quantitativement et fonctionnellement (Woolard *et al.*, 2004).

Facteur de croissance essentiel dans l'embryogenèse et dans le processus de guérison des blessures, le VEGFA exprimé par des cellules carencées en oxygène recrute les cellules endothéliales par sa liaison au récepteur VEGFR-2; il induit leur migration, prolifération et survie par l'activation des cascades Raf-Mek-ERK et PI3K/Akt (Shibuya et Claesson-Welsh, 2006). Les cellules endothéliales s'organisent alors et forment de petits tubes suivant le gradient de VEGFA. Ce nouveau réseau de capillaires permet dès lors des conditions propices à la survie cellulaire (Olsson *et al.*, 2006). Cependant, les cellules cancéreuses ayant activé la « switch angiogénique » utilisent ce même mécanisme de survie pour sustenter leur potentiel de prolifération infini (Ferrara, 2004).

En effet, la réplication excessive des cellules cancéreuses mène rapidement à une sous-vascularisation du centre de la tumeur, entraînant l'hypoxie et la nécrose des cellules qui la composent. En réaction, les cellules tumorales ainsi que les monocytes sur place produisent du VEGFA afin de rapatrier les cellules endothéliales nécessaires à la formation de nouveaux capillaires (Byrne, Bouchier-Hayes et Harmey, 2005). En plus de l'effet paracrine

proangiogénique du VEGFA, ce dernier favorise également la survie de certaines cellules tumorales de manière autocrine (Bachelder *et al.*, 2001 ; Dias *et al.*, 2001). Cependant, sans l'apport du récepteur à tyrosine kinase au « platelet-derived growth factor » ou PDGF, l'activation de VEGFR-2 par le VEGFA chez les cellules endothéliales produit des vaisseaux immatures, instables et très perméables (Gerhardt et Betsholtz, 2003).

### 1.2.2 Le récepteur à tyrosine kinase PDGFR- $\beta$

La molécule nommée « platelet-derived growth factor » ou PDGF, originalement isolée à partir de plaquettes humaines, s'est avérée être en fait un dimère de deux différentes chaînes polypeptidiques, soit les chaînes A (Betsholtz *et al.*, 1986) et B (Johnsson *et al.*, 1984). Récemment, deux nouvelles chaînes se sont ajoutées à la liste, soit les chaînes C (Li *et al.*, 2000) et D (Bergsten *et al.*, 2001 ; LaRochelle *et al.*, 2001). Structuellement similaire à la famille du VEGF (Betsholtz, 2003), le PDGF, sous sa forme biologiquement active, forme un dimère covalent réuni par des liens disulfides, dont certains sont essentiels pour la conformation active de la molécule (Oefner *et al.*, 1992). Jusqu'à présent, cinq différents assemblages ont été identifiés, soit : les formes PDGF-AA, -BB, -AB, -CC et -DD (Heldin, Eriksson et Ostman, 2002). Ces dimères agissent en tant que ligands aux récepteurs PDGFR- $\alpha$  et - $\beta$  pouvant également former des homodimères PDGFR- $\alpha\alpha$  ou - $\beta\beta$  et un hétérodimère PDGFR- $\alpha\beta$  (Betsholtz, 2003).

Bien que le PDGF soit exprimé jusqu'à l'âge adulte, il joue un rôle particulièrement crucial lors de l'embryogenèse. Ainsi, les essais *knock-out* sur des souris ont démontré qu'une déficience en PDGF-AA entraîne la mort de l'embryon avant le dixième jour suivant la conception, ou entraîne dans certains cas une mort prématurée après la naissance. Ces souris démontrent, entre autres, un développement des alvéoles pulmonaires défaillant et des problèmes moteurs. La délétion du gène du PDGF-BB est également létale lors du dernier trimestre de gestation, puisqu'elle entraîne un développement rénal déficient ainsi qu'un développement cardiovasculaire défaillant causé par des vaisseaux sanguins anormaux (Yu, Ustach et Kim, 2003).

Lors de l'angiogenèse, ce sont les cellules endothéliales qui produisent du PDGF-BB qui, tel le VEGF pour ces dernières, induit la migration, la prolifération et la survie des péricytes et des cellules musculaires lisses par l'intermédiaire du récepteur PDGFR- $\beta$  exprimé à la surface de ces cellules (Figure 1.2) (Betsholtz, 2003). Ces cellules nouvellement recrutées viendront stabiliser les capillaires fraîchement créés par les cellules endothéliales en régulant leur diamètre et, conséquemment le flux sanguin (Gerhardt et Betsholtz, 2003), ainsi qu'en stimulant la survie des cellules endothéliales (Carmeliet, 2000). Ce mécanisme de maturation des vaisseaux sanguins par l'action du PDGF-BB joue également un rôle crucial lors de l'angiogenèse tumorale, puisqu'il assure l'approvisionnement en oxygène et en nutriments à la tumeur (Betsholtz, 2003).

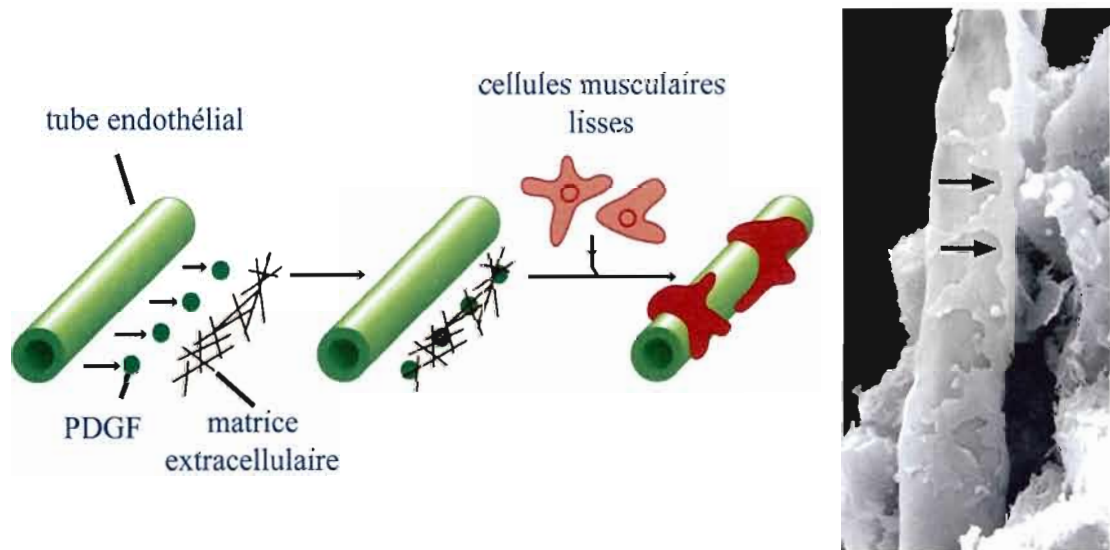


Figure 1.2 : Stabilisation du réseau de cellules endothéliales par les cellules musculaires lisses. Adapté de (Weinberg, 2007).

### 1.2.3 Les thérapies antiangiogéniques

Utiliser l'angiogenèse tumorale comme cible thérapeutique dans le traitement du cancer est un objectif élégant, puisqu'il se résume à empêcher la tumeur de proliférer en lui



couplant les vivres. Cette approche est également attrayante dans un contexte de prévention, où l'utilisation d'inhibiteurs de l'angiogenèse a pour but de convertir le cancer en maladie chronique gérable en maintenant la tumeur à une taille inoffensive pour son hôte (Ezzell, 1998). Les capillaires tumoraux sont une cible intéressante, puisque résultant d'une mauvaise balance dans l'expression des facteurs proangiogéniques et antiangiogéniques; ceux-ci sont à l'opposé des capillaires sains, nombreux et construits de façon chaotique. Les capillaires tumoraux sont tellement désorganisés qu'il est courant de retrouver des cellules cancéreuses assimilées à l'intérieur des murs de cellules endothéliales (Bergers et Benjamin, 2003). De plus, les cellules endothéliales recrutées par la tumeur possèdent l'avantage d'être génétiquement stables, limitant les risques de développer une résistance aux agents thérapeutiques. Ainsi, la thérapie antiangiogénique est basée sur l'hypothèse que traiter les cellules cancéreuses et les cellules endothéliales recrutées par la tumeur serait plus efficace que traiter les cellules cancéreuses uniquement (Folkman, 2006).

Le premier inhibiteur de l'angiogenèse, approuvé en février 2004 par la « Food and Drug Administration » ou FDA des États-Unis, a été développé pour le traitement du cancer du côlon. Nommé Avastin (bevacizumab), cet anticorps monoclonal dirigé contre le VEGFA, a été le premier médicament à démontrer, en complément à la chimiothérapie, une prolongation significative de la survie chez les patients à un stade avancé du développement de la maladie, comparativement à la chimiothérapie seule (Hurwitz *et al.*, 2004). Depuis, les thérapies antiangiogéniques ont démontré une augmentation significative de la survie chez les patients souffrant du cancer du poumon, du sein (Herbst *et al.*, 2006) ou étant à un stade avancé de cancer du rein (Escudier *et al.*, 2007). Cependant, viser uniquement le VEGFA en circulation peut s'avérer inefficace; ainsi, même si certains cancers produisent initialement seulement du VEGF, au fil du temps ceux-ci peuvent exprimer d'autres protéines angiogéniques à la suite de nouvelles mutations (Ferrara et Kerbel, 2005 ; Relf *et al.*, 1997).

Une autre approche prometteuse et complémentaire consiste à cibler directement les récepteurs à tyrosine kinase VEGFR et PDGFR afin de bloquer la signalisation induite par ceux-ci. Ainsi, l'inhibition de ces deux récepteurs par le Sunitinib et le Sorafenib, médicaments également approuvés par la FDA (Faivre *et al.*, 2007 ; Folkman, 2007), a



démontré un effet très intéressant, entre autres chez les patients souffrant du cancer du rein (Escudier *et al.*, 2007 ; Motzer *et al.*, 2006). Dernièrement, lors d'une étude clinique de phase III, le Sunitinib a démontré une augmentation significative de la survie chez les patients atteints du cancer du rein traités avec cet inhibiteur, comparativement à ceux traités avec l'interféron alpha, un traitement conventionnel de première ligne pour ce type de cancer (Motzer *et al.*, 2007).

Bien que le test ultime pour ces inhibiteurs sera l'évaluation de leur efficacité en combinaison avec les traitements conventionnels de chimiothérapie et de radiothérapie (Kerbel, 2008), il n'en demeure pas moins que l'utilisation d'agents ciblant les récepteurs à tyrosine kinase, qui agissent à la fois sur le recrutement des cellules endothéliales ainsi que sur les péricytes et cellules musculaires lisses, représente une approche prometteuse. Ainsi, la diminution du recrutement de cellules murales au moyen de l'inhibition de la signalisation induite par PDGFR- $\beta$ , entraîne la dilatation des capillaires tumoraux et augmente l'apoptose des cellules endothéliales, puisque celles-ci ne bénéficient plus des facteurs de croissance produits par les péricytes et les cellules musculaires lisses. En complément, l'inhibition de la signalisation induite par VEGFR-2 bloque la prolifération des cellules endothéliales et prévient la croissance des capillaires, en plus d'induire la régression des capillaires existants en augmentant la mort des cellules endothéliales (Figure 1.3) (Carmeliet, 2005).

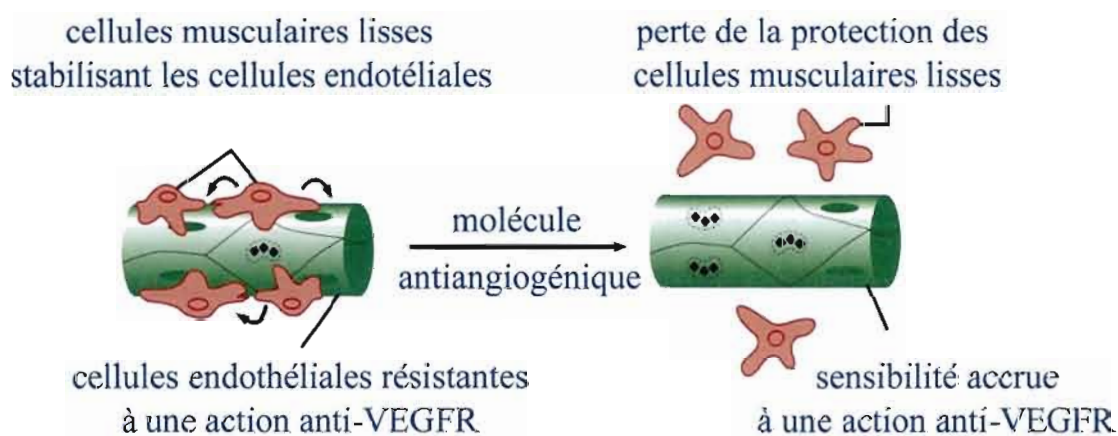


Figure 1.3 : Sensibilisation des cellules endothéliales suite à un traitement contre PDGFR- $\beta$ . Adapté de (Weinberg, 2007).

#### 1.2.4 Les thérapies antiangiogéniques et les médulloblastomes

Certains médicaments utilisés dans le traitement du cancer en tant qu'agents de chimiothérapie cytotoxiques conventionnels ont démontré, en plus d'un effet sur les cellules normales et tumorales, un effet sur la croissance des vaisseaux sanguins. Cet effet antiangiogénique est plus marqué lorsque ces médicaments sont données en petites doses sur une base hebdomadaire ou même quotidienne, plutôt qu'à intervalles plus éloignés sous fortes doses (Browder *et al.*, 2000). Cette approche est nommée chimiothérapie métronomique. En plus des effets antiangiogéniques liés à cette méthode, celle-ci suscite également beaucoup moins d'effets secondaires indésirables que sa contrepartie conventionnelle (Kerbel et Kamen, 2004). La première étude pédiatrique utilisant plusieurs agents de chimiothérapie de façon métronomique sur une population en phase terminale a démontré des résultats encourageants, dont une très bonne tolérance à la médication. Dans cette cohorte, un patient atteint d'un médulloblastome a très bien réagi à la médication et était encore en vie 126 semaines après la fin de son traitement (Kieran *et al.*, 2005).

Jusqu'à récemment, la corrélation entre la survie et l'architecture vasculaire chez les patients atteints de médulloblastome n'était pas claire. Une étude portant sur 23 patients avec médulloblastomes a démontré qu'à une densité élevée de vaisseaux sanguins correspondait un pronostic défavorable significatif (Ozer *et al.*, 2004). Cependant, une autre étude portant sur 78 enfants avec médulloblastomes a conclu que la densité des vaisseaux sanguins n'était pas garante d'un quelconque pronostic (Grotzer *et al.*, 2001). Malgré tout, les auteurs s'entendent pour dire que les médulloblastomes sont de bons candidats pour les thérapies antiangiogéniques (Grotzer *et al.*, 2001).

En fait, une reconstruction en trois dimensions du cortex cérébral chez des patients atteints de différents sous-types de médulloblastomes a démontré que par comparaison aux patients sains, le réseau de microcapillaires pouvait soit être particulièrement dense ou encore moins bien distribué. Cependant, cette étude a clairement démontré la nature désorganisée et tortueuse de la vascularisation de certains sous-types de médulloblastomes, pointant l'importance de l'angiogenèse tumorale dans ce type de cancer (Gilhuis *et al.*, 2006).

Les médulloblastomes produisent une large gamme de facteurs proangiogéniques, dont le VEGFA représente le facteur principal (Huber *et al.*, 2001). En plus, les médulloblastomes hautement métastatiques expriment le récepteur PDGFR- $\beta$  qui, en réponse au PDGF-BB sécrété par les cellules endothéliales, induit la survie et la migration cellulaire chez les cellules tumorales (Gilbertson et Clifford, 2003), faisant des médulloblastomes une cible intéressante pour les thérapies antiangiogéniques (Grizzi, Weber et Di Ieva, 2008).

Récemment, un inhibiteur de VEGFR-1, -2 et -3 ainsi que de PDGFR- $\beta$ , le AZD2171, a été testé lors d'une phase préclinique sur des patients souffrant de différents cancers pédiatriques. Parmi ceux-ci, trois étaient atteints de médulloblastomes et un seul a démontré une réponse antitumorale positive (Maris *et al.*, 2008). On peut espérer qu'en combinaison avec les traitements de chimiothérapie conventionnels administrés de manière métronomique, les médicaments antiangiogéniques permettront de diminuer les séquelles à long terme généralement lourdes chez les enfants atteints de médulloblastomes.

### 1.3 La formation de métastases

Résultat de la colonisation d'autres organes par des cellules cancéreuses issues de la tumeur primaire, les métastases représentent la cause principale de décès des suites d'un cancer dans près de 90 % des cas de tumeurs solides (Gupta et Massague, 2006), bien que certains cancers spécifiques tels les glioblastomes n'en forment que rarement (Gilbertson et Rich, 2007). Comparant la cellule tumorale à une « graine » et l'environnement de l'hôte au « sol », Stephen Paget posa en 1889 l'une des observations les plus persistantes sur les métastases : « Lorsqu'une plante libère ses graines, celles-ci sont portées dans toutes les directions; cependant, elles ne peuvent survivre et pousser que si elles tombent sur le bon sol » (Paget, 1889).

La formation de métastases est un processus qui comporte plusieurs étapes, où une cellule tumorale doit acquérir de nombreux traits avant de parvenir à la colonisation d'un site secondaire propice à sa survie. Ainsi, elle doit être en mesure : (1) de procéder à l'invasion de

la matrice extracellulaire, (2) de pénétrer le réseau vasculaire ou lymphatique par intravasation, (3) de survivre au passage dans la circulation et d'être en mesure d'adhérer à la paroi des vaisseaux, (4) de sortir de la circulation sanguine par extravasation, (5) de survivre sous forme de micrométastases et (6) d'être en mesure de proliférer et de s'étendre en ce nouveau site par une angiogenèse soutenue (Figure 1.4) (Steeg, 2006).

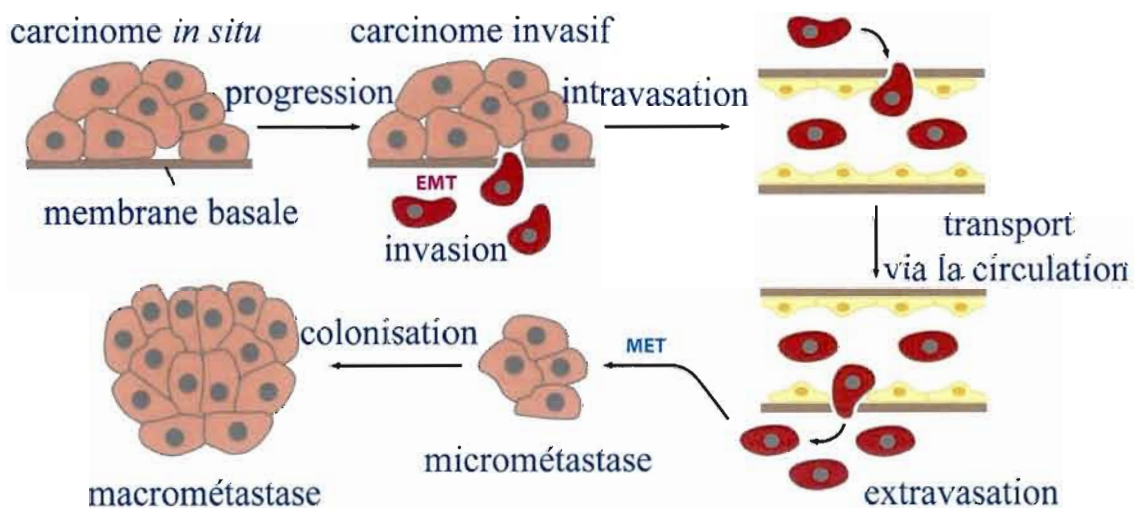


Figure 1.4 : Schéma décrivant la formation de métastases. EMT correspond à la transition du phénotype épithélial vers le phénotype mésenchymal tandis que MET réfère au retour du phénotype épithélial. Adapté de (Weinberg, 2007).

Cependant, il n'est encore possible d'observer la présence de métastases chez l'humain que lorsqu'elles ont passé au travers de toutes ces étapes et sont d'une taille suffisamment importante pour être observées en imagerie (Steeg, 2006). Pour cette raison, les différentes étapes liées à la formation de métastases ainsi que les mécanismes moléculaires sous-jacents représentent des cibles attrayantes dans le traitement du cancer (Steeg et Theodorescu, 2008). Parmi les cibles particulièrement intéressantes, nous retrouvons les récepteurs à tyrosines kinase EGFR et Met, qui régulent des signaux cruciaux induisant la prolifération, la migration et l'invasion cellulaire (Gupta et Massague, 2006).

### 1.3.1 Les récepteurs à tyrosine kinase *ERBB*

Le « epidermal growth factor » ou EGF revêt une importance particulière en biologie cellulaire puisqu'il est le premier facteur de croissance à avoir été identifié. Sa découverte a permis de lever le voile sur un pan complet de la signalisation cellulaire par l'identification du premier récepteur à tyrosine kinase connu, ERBB-1 (aussi connus sous EGFR/HER1) (Carpenter, King et Cohen, 1978). Depuis, douze ligands se sont ajoutés à l'EGF, dont le « transforming growth factor alpha » ou TGF- $\alpha$  et trois nouveaux récepteurs ont enrichi la famille, soit : ERBB-2 (HER2/neu), ERBB-3 (HER3) et ERBB-4 (HER-4) (Citri et Yarden, 2006). Ces quatre récepteurs à tyrosine kinase jouent un rôle essentiel dans la prolifération et la différenciation cellulaire ainsi que dans le développement et le maintien de l'homéostasie chez les mammifères. En effet, un *knock-out* de l'un ou de l'autre de ces récepteurs chez la souris mène à une mort certaine, soit à l'état embryonnaire ou encore à la naissance, ainsi qu'à de nombreuses anomalies développementales, dont plusieurs du système cardiovasculaire et nerveux. De plus, le *knock-out* de certains ligands est létal ou entraîne des dysfonctions sévères (Iwamoto et Mekada, 2006).

L'activation de ces récepteurs s'effectue par l'action de l'un des ligands, qui entraîne la dimérisation des récepteurs en l'une ou l'autre des combinaisons d'homodimères et d'hétérodimères possibles (Schlessinger, 2002). Fait intéressant, ERBB-2 ne possède pas de site de liaison extracellulaire, rendant impossible toute interaction avec un ligand, tandis que ERBB-3 ne possède pas d'activité kinasique dans son domaine intracellulaire (Yarden et Sliwkowski, 2001). Cependant, lorsque sous forme d'hétérodimère, ERBB-3 subit une phosphorylation sur tyrosine qui mène au recrutement et à la très forte activation de la voie PI3K/Akt, entraînant l'activation de la survie et de la migration cellulaire, et ce, particulièrement lorsqu'associé avec ERBB-2. En fait, ERBB-2 est l'hétérodimère préféré de ses trois autres partenaires et, de par sa structure, prolonge la durée des signaux mitogéniques en entraînant une dissociation beaucoup plus lente entre le ligand et le récepteur, en étant endocytosé plus lentement et en étant recyclé plus fréquemment à la surface de la cellule (Citri et Yarden, 2006). De plus, ERBB-2 est en mesure de former un homodimère et d'activer les signaux cellulaires en l'absence complète de ligand (Schlessinger, 2002).

Ce mécanisme explique le rôle prépondérant de ce récepteur dans le processus de transformation cellulaire dans les cancers où il est surexprimé. L'exemple le plus connu est la découverte en 1984 de la surexpression de ERBB-2 dans le cancer du sein (Schechter *et al.*, 1984). Cette surexpression, répandue chez près de 20 à 30 % des patientes atteintes d'un cancer du sein invasif, réduit l'espérance de vie de ces dernières. L'activation des voies Raf-Mek-ERK et PI3K/Akt par ERBB-2 contribue à stimuler la prolifération, la survie et la mobilité cellulaire, en plus d'augmenter le potentiel invasif de celles-ci. De plus, la signalisation cellulaire via ERBB-2 entraîne la production de VEGFA par la cellule tumorale, favorisant l'angiogenèse tumorale et, de ce fait, augmentant les possibilités qu'une cellule cancéreuse emprunte le réseau sanguin pour métastaser (Hudis, 2007). Il va sans dire que ERBB-2 est un joueur clé dans le processus de formation de métastases et qu'il représente une cible particulièrement intéressante dans notre lutte au cancer. Cependant, l'utilisation d'inhibiteurs sur l'un ou l'autre des membres de la famille ERBB peut mener à des résultats surprenants. Ainsi, l'utilisation d'un inhibiteur envers l'activité de ERBB-1 a mené à l'émergence d'une voie compensatrice induite par le récepteur à tyrosine kinase Met et ERBB-3, compensation qui pourrait être également présente avec l'inhibition de ERBB-2 (Engelman *et al.*, 2007).

### 1.3.2 Le récepteur à tyrosine kinase Met

La découverte du récepteur à tyrosine kinase Met, en 1989 (Giordano *et al.*, 1989), découle de l'identification d'un oncogène activé au sein d'une lignée cellulaire humaine chimiquement transformée, produisant la protéine de fusion TRP-Met, protéine constitutivement phosphorylée (Cooper *et al.*, 1984). Ses deux ligands connus, soit le « scatter factor » ou SF (Stoker *et al.*, 1987) et le « hepatocyte growth factor » ou HGF (Nakamura *et al.*, 1989), découverts par deux équipes distinctes, s'avéreront être en fait une seule et unique molécule (nommée HGF pour des fins de simplification) (Weidner *et al.*, 1991). Met est également un récepteur crucial lors de l'embryogenèse et de la formation des organes. Ainsi, une mutation homozygote de *met* ou de son ligand *hgf* entraîne la mort *in*



*utero* chez la souris des suites de sévères dysfonctions au niveau du développement placentaire (Uehara *et al.*, 1995). À l'âge adulte, Met est nécessaire à la régénération du foie (Huh *et al.*, 2004) et au processus de guérison des blessures de la peau (Chmielowiec *et al.*, 2007).

Pour ce faire, l'activation de Met dans les cellules épithéliales induit plusieurs réponses biologiques qui induisent à leur tour un programme morphogénique complexe menant à l'invasion et à la croissance cellulaire. Ce processus multiétapes implique (1) la diffusion cellulaire, (2) la dissociation des interactions cellules-cellules, (3) l'acquisition d'un phénotype de motilité cellulaire, (4) la migration et (5) l'établissement de la cellule dans un nouvel environnement (Gentile, Trusolino et Comoglio, 2008). Afin de compléter ces différentes étapes, Met active, entre autres, les voies de Raf-Mek-ERK et PI3K/Akt, voies impliquées dans la migration et la survie cellulaire (Figure 1.5) (Trusolino et Comoglio, 2002).

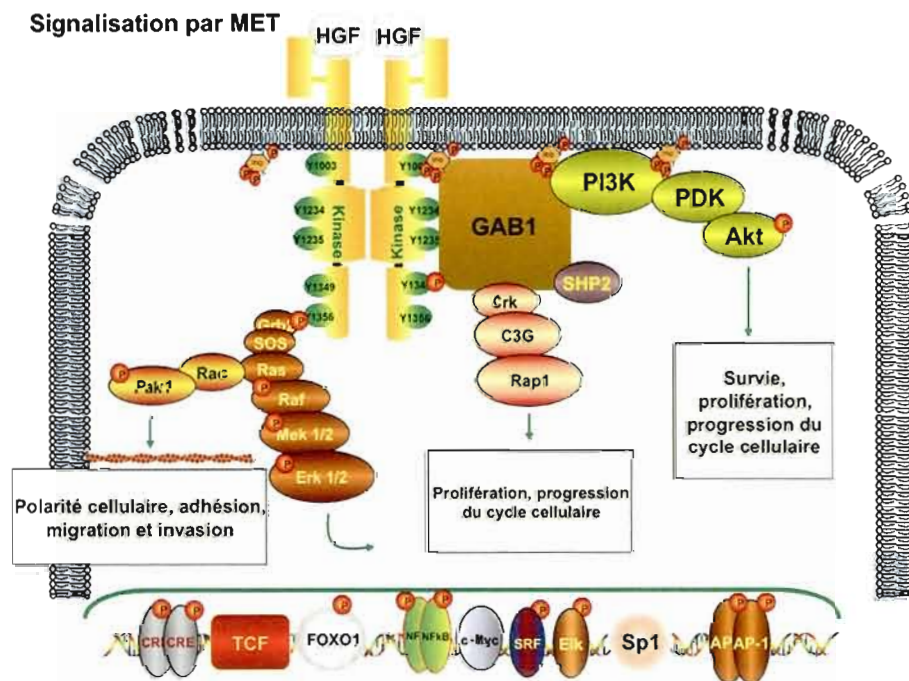


Figure 1.5 : Schéma de la cascade de signalisation classique de Met. Adapté de ScienceSlides.

Par contre, ce processus multiétapes, lorsqu'activé dans les mauvaises circonstances, confère aux cellules cancéreuses le potentiel invasif nécessaire à la formation de métastases. Ainsi, l'activation de Met entraîne la formation de métastases et, en conséquence, entraîne un mauvais pronostic dans nombre de cancers (Birchmeier *et al.*, 2003). Son activation est possible grâce à divers mécanismes, dont (1) une mutation rendant le récepteur constitutivement activé, (2) une activation autocrine ou paracrine advenant que la tumeur ou les cellules environnantes produisent une forte quantité de HGF ou simplement (3) une surexpression de Met menant à son oligomérisation et son activation de façon indépendante du ligand (Boccaccio et Comoglio, 2006). Si Met est régulièrement utilisé comme marqueur d'un cancer, il est également garant d'un mauvais pronostic dans de nombreux cancers, dont ceux du colon, du sein, de la tête et du cou, du foie, du rein ou encore du poumon (Birchmeier *et al.*, 2003). Son rôle indubitable dans la progression tumorale fait de Met une cible importante dans la lutte contre le cancer (Migliore et Giordano, 2008).

### 1.3.3 Les thérapies antimétastatiques

Malgré les nombreuses années consacrées au développement et à l'essai de nouvelles thérapies, la mortalité liée à plusieurs types de cancers n'a été réduite que très peu, quelques mois au mieux. Encore aujourd'hui, la plupart des patients succombent des suites de métastases ou des complications liées à leur traitement, pointant l'importance du développement de thérapies permettant d'empêcher la formation de métastases ou de traiter celles déjà existantes chez les patients à un stade plus avancé (Steeg et Theodorescu, 2008).

Le cancer du sein représente un exemple éloquent où les thérapies antimétastatiques ont joué un rôle marquant dans l'élaboration de nouvelles approches pour son traitement. Malgré l'avancement considérable dans le diagnostic du cancer du sein, plus de 44 000 femmes meurent chaque année aux États-Unis des suites de métastases issues de la tumeur primaire (Hortobagyi, 1998 ; Landis *et al.*, 1999). La surexpression de ERBB-2 dans près du tiers des cas, synonyme d'une agressivité accrue, représente une cible particulièrement intéressante pour ces patientes pour qui les traitements de chimiothérapie sont généralement



inefficaces. De plus, la surexpression de ERBB-2, beaucoup plus élevée dans les cellules cancéreuses que dans les cellules saines, et sa répartition homogène à la surface des cellules de la tumeur primaire ainsi que sur celles aux sites de métastases, permet à une thérapie anti-ERBB-2 d'atteindre pratiquement toutes les cellules cancéreuses préférentiellement aux cellules saines (Nahta *et al.*, 2006). Approuvé en 1998 par la FDA, l'Herceptin (trastuzumab) est un anticorps monoclonal dirigé contre le domaine extracellulaire du récepteur à tyrosine kinase ERBB-2. Bien qu'inefficace lorsqu'utilisé en monothérapie (Vogel *et al.*, 2002), le trastuzumab utilisé avec la chimiothérapie augmente de façon cliniquement significative la survie des patientes aux prises avec un cancer du sein métastatique (Esteva *et al.*, 2002 ; Slamon *et al.*, 2001). Suite à cette réussite, plusieurs autres inhibiteurs de la famille des ERBB se sont ajoutés au trastuzumab. Ainsi, sont également approuvés par la FDA l'anticorps Erbitux (cetuximab) utilisé pour le traitement du cancer colorectal, et les petites molécules Tarceva (erlotinib) et Iressa (gefitinib) utilisées dans le traitement du cancer du poumon (Collins et Workman, 2006).

Des efforts similaires à ceux ayant mené au développement de ces médicaments sont actuellement déployés afin de mettre au point une thérapie ciblant la tyrosine kinase Met. Les récents travaux pointant l'implication de Met dans la résistance aux traitements contre la famille des ERBB, tel le gefitinib (Engelman *et al.*, 2007) ou l'erlotinib (Bean *et al.*, 2007), mettent au jour l'importance de ce récepteur à tyrosine kinase, non seulement en tant que cible d'un traitement primaire, mais également comme cible complémentaire à d'autres traitements. De nombreuses études de phases cliniques utilisant des anticorps monoclonaux ou des inhibiteurs de tyrosines kinases sont actuellement en cours (Migliore et Giordano, 2008). Récemment, l'un d'eux, l'anticorps AMG 102, a passé avec succès la première étape concernant l'étude de la pharmacocinétique et de la toxicité (Kakkar *et al.*, 2007).

Cependant, ces traitements sont plus efficaces lorsqu'il s'agit de prévenir la formation de métastases. Or, de nombreux patients présentent des métastases au moment du diagnostic ou du traitement. C'est le cas de près de 10 % des patients souffrant du cancer du sein ou de la prostate, 20 % de ceux atteints du cancer colorectal et 40 % de ceux victimes du cancer du poumon, sans compter tous ceux présentant des micrométastases encore

indétectables par les techniques d'imagerie actuelles. Pour ces patients, l'approche à prioriser est de cibler à la fois les voies impliquées dans le processus de formation de métastases et d'angiogenèse tumorale (Steeg, 2006). En effet, l'angiogenèse tumorale procure à la tumeur primaire une échappatoire de prédilection pour la formation de métastases, en plus de fournir l'oxygène et les nutriments nécessaires aux micrométastases afin qu'elles croissent (Gupta et Massague, 2006). C'est dans cet esprit qu'une combinaison d'erlotinib (anti-ERBB-1) et de bevacizumab (anti-VEGF) a été expérimentée avec succès dans le cadre d'études cliniques sans groupe témoin, afin de traiter le cancer du poumon (Herbst *et al.*, 2005) et le cancer du rein (Hainsworth *et al.*, 2005). Une autre étude sur le cancer du poumon a démontré que la combinaison de bevacizumab/erlotinib ou de bevacizumab/chimiothérapie augmentait significativement la durée de la survie sans progression de la maladie. De plus, bien que d'une efficacité équivalente à la combinaison bevacizumab/chimiothérapie, l'utilisation de bevacizumab/erlotinib était un traitement d'une toxicité moindre pour les patients (Herbst *et al.*, 2007). Ces résultats font foi d'une nouvelle percée dans le traitement du cancer, où une approche moléculaire visant à la fois les mécanismes responsables de la formation de métastases et de l'angiogenèse tumorale permet d'augmenter l'espérance ainsi que la qualité de vie des patients.

#### ***1.3.4 Les thérapies antimétastatiques et les médulloblastomes***

Le développement de traitements axés sur les mécanismes de signalisation cellulaire des cellules tumorales représente une approche d'avenir, spécialement dans le traitement des cancers pédiatriques. Manifestement, les effets cytotoxiques des traitements conventionnels utilisés afin de traiter les médulloblastomes pédiatriques sont particulièrement dommageables chez les enfants qui, en pleine croissance, développent de lourdes séquelles développementales (Gilbertson, 2004). Puisque fortement agressifs et hautement métastatiques (près de 30 % des enfants présentent des métastases lors du diagnostic), les thérapies antimétastatiques visant les mécanismes de signalisation cellulaire revêtent un espoir particulier dans le traitement des médulloblastomes (Crawford, MacDonald et Packer, 2007 ; Gilbertson et Gajjar, 2005).

L'une des cibles moléculaires les plus prometteuses est sans doute le récepteur à tyrosine kinase ERBB-2. En effet, suite à l'étude de plus de 150 médulloblastomes pédiatriques, l'expression de la protéine ERBB-2 a été démontrée dans plus de 80 % des cas (Gajjar *et al.*, 2004 ; Gilbertson *et al.*, 2001 ; Gilbertson *et al.*, 1997). Ce résultat est d'autant plus intéressant que ERBB-2 n'est pas exprimé dans les cellules saines du cervelet et ce, peu importe le stade de développement (Gilbertson *et al.*, 1998), et que sa surexpression est associée à un stade métastatique plus avancé ainsi qu'à un mauvais pronostic (Gilbertson *et al.*, 1998 ; Gilbertson *et al.*, 1997). Des études cliniques de phase I et II sont actuellement en cours au sein du « Children's Oncology Group and the US Pediatric Brain Tumor Consortium » afin de valider l'intérêt de ERBB-2 en tant que cible thérapeutique dans le traitement des médulloblastomes (Gilbertson, 2004).

Cependant, l'inhibition d'un membre de la famille de ERBB peut mener à l'émergence d'une voie compensatoire par la cellule tumorale, telle que celle du récepteur à tyrosine kinase Met dans le cas du cancer du poumon (Engelman *et al.*, 2007). Cette découverte met en perspective la récente manifestation de HGF et son récepteur Met, en tant que nouvelle voie moléculaire impliquée dans la croissance et le développement des médulloblastomes (Li *et al.*, 2007 ; Li *et al.*, 2005). En effet, bien que Met à lui seul revêt une importance particulière dans la formation de métastases dans plusieurs types de cancers (Birchmeier *et al.*, 2003 ; Trusolino et Comoglio, 2002), il devient maintenant également une cible complémentaire importante dans l'optique d'un traitement moléculaire visant ERBB-2 dans les médulloblastomes. Moins avancés sur le plan clinique que les inhibiteurs de la famille ERBB, les inhibiteurs pharmacologiques de Met sont actuellement sous examen dans plusieurs études cliniques qui porteront fruits d'ici quelques années (Migliore et Giordano, 2008).

#### 1.4 La vision Darwinienne du cancer

Le cancer n'est pas un désordre qui touche uniquement les humains, puisque toutes les classes de vertébrés développent des tumeurs et le cancer (Schlumberger et Lucke, 1948), tout comme les mollusques et autres espèces invertébrées (Greaves, 2007). Aussi loin qu'il nous soit possible de remonter dans le temps, le cancer était présent tel qu'en témoigne les tumeurs ou les cancers métastatiques qui ont été découverts dans les fossiles de dinosaures datant de la période du Jurassique (Rothschild *et al.*, 1998 ; Rothschild, Witzke et Herschkovitz, 1999). En fait, tout être multicellulaire est sujet à voir la cohésion sociale de ses différentes cellules perturbée par un clone, dont sa priorité n'est plus de servir l'organisme mais ses propres intérêts (Greaves, 2007). Cependant, bien que le cancer existe chez les autres organismes du règne animal, il est loin d'être aussi prévalent que chez les humains. À titre d'exemple, les résultats d'autopsies systématiques sur des milliers d'animaux démontrent qu'environ 11 % des chevaux (Cotchin, 1977) et seulement 1 à 2 % des primates (Greaves, 2007) développeraient le cancer.

Il est possible d'expliquer une partie de cette différence par le principe de sélection naturelle élaboré par Charles Darwin, en 1859. La sélection naturelle favorisant les organismes les mieux équipés pour faire face aux conditions du moment actuel, elle peut privilégier des organismes nettement dysfonctionnels aux conditions de demain dans un environnement sujet à des changements rapides. Ainsi, depuis plus de 200 000 ans, les humains ont été sélectionnés par les pressions évolutionnelles énormes constituées d'épidémies mortelles ou de cataclysmes environnementaux. Cependant, de par leur rapide évolution sociale et culturelle, les humains se sont éloignés grandement des conditions extrêmes prévalant à l'Âge de pierre, conditions pour lesquelles ils étaient adaptés (Greaves, 2007).

Selon la société canadienne du cancer, au Canada, trois sièges de cancer sont responsables de la majorité des nouveaux cas chez les deux sexes, soit les cancers du sein, du poumon et du côlon/rectum chez les femmes, et les cancers de la prostate, du poumon et du côlon/rectum chez les hommes. Il est intéressant de mettre en perspective les causes de ces

principaux cancers avec nos habitudes de vie qui sont maintenant à des lieux de celles de nos ancêtres. Ainsi, les cancers du sein et de la prostate peuvent être en partie expliqués par les changements radicaux au niveau de nos habitudes de reproduction, qui ne favorisent plus des grossesses répétées en bas âge, ainsi que par l'augmentation fulgurante de notre espérance de vie qui va bien au-delà de notre période de reproduction (Eaton *et al.*, 1994 ; Greaves, 2007). Les cancers du poumon sont quant à eux directement attribuables aux habitudes de tabagisme dans une proportion qui varie entre 80 et 90 % (Hammond et Seidman, 1980). Finalement, les cancers du côlon et du rectum sont attribuables à près de 75 % à de mauvaises habitudes alimentaires. En fait, les chercheurs s'accordent pour dire que près du tiers de tous les décès causés par le cancer sont attribuables à l'alimentation et un autre tiers à la cigarette (WCRF/AICR, 2007).

### 1.5 Lien alimentation/cancer

Le lien entre l'importance de l'alimentation dans la prévention de la maladie a été soupçonné il y a bien longtemps. Ainsi, l'une des citations les plus connues d'Hippocrate (460-377 av. J.-C.), célèbre médecin et savant grec est : « Que ton aliment soit ta seule médecine ». Cependant, il aura fallu attendre jusqu'à tout récemment avant d'obtenir la preuve irréfutable qu'une maladie, telle le cancer, peut être prévenue par une bonne alimentation. Ce n'est que suite à la compilation de 500 000 études épidémiologiques (incluant les études transversales, de cohortes et de cas-témoins), études en laboratoires (*in vitro* et *in vivo*) et essais contrôlés sur 20 différents types de cancers et ce, par neuf centres indépendants, que les scientifiques ont reconnu d'une même voix qu'environ le tiers des cancers sont directement liés à une mauvaise alimentation. Ce sont les conclusions de la plus grande revue de littérature jamais effectuée sur le sujet et résumée dans le rapport du « World Cancer Research Fund / American Institute for Cancer Research » intitulé : « Food, Nutrition, Physical Activity, and the Prevention of Cancer : a Global Perspective » (WCRF/AICR, 2007).

Selon ce rapport, les cancers de l'estomac, du côlon/rectum et de l'œsophage peuvent être prévenus par l'alimentation dans 75 % des cas, le cancer du foie dans 66 % des cas, les cancers du sein et de la bouche/pharynx dans 50 % des cas, le cancer du poumon dans 33 % des cas et les cancers du col de l'utérus et de la prostate dans 20 % des cas (WCRF/AICR, 2007). L'une des preuves les plus révélatrices de cette réalité sont les études sur les populations migrantes et les variations dans les niveaux de cancer. L'une de ces études a comparé les niveaux de différents cancers affectant les Japonais et les Japonais émigrés à Hawaii à la population caucasienne hawaïenne locale. Ainsi, le niveau de cancer de la prostate, généralement bas chez la population japonaise de l'époque, a augmenté d'un facteur 10 chez les immigrants japonais basés à Hawaii, au point de se rapprocher au niveau de la population caucasienne. Inversement, les niveaux de cancer de l'estomac ont diminué considérablement au point d'être comparables à ceux des Caucasiens. Ces exemples sont corroborés par le même type d'études effectué sur les niveaux de cancers de la population africaine et afro-américaine comparés à ceux des blancs des États-Unis (Doll et Peto, 1981). Il en ressort que les niveaux de cancers sont grandement attribuables au mode de vie des individus, dont l'alimentation représente l'un des éléments principaux.

## **1.6 La nutrathérapie**

Si le cancer est un incontournable de tout organisme multicellulaire, il n'en demeure pas moins qu'il nous est possible d'en diminuer la prévalence en modifiant certaines de nos habitudes de vie. Ce sont les bases du concept de « nutrathérapie ». L'une des recommandations principales en terme de prévention du cancer par l'alimentation, est de manger un maximum de fruits et de légumes, soit un minimum de cinq portions par jour, puisque ces aliments regorgent de nutriments, sont riches en fibres, possèdent une faible densité calorique et contiennent une abondance de composés phytochimiques (WCRF/AICR, 2007). Malgré que le rôle exact de ces composés demeure encore partiellement compris, le « National Cancer Institute » a déterminé qu'il existerait plus de 1000 composés phytochimiques différents possédant des propriétés en prévention du cancer et que plus de

100 différents composés phytochimiques seraient présents dans chaque portion de fruits et de légumes (Surh, 2003).

Afin d'aller un peu plus loin dans notre compréhension des mécanismes sous-jacents à l'effet protecteur de notre diète, il est crucial d'accorder autant de rigueur à l'étude des composés phytochimiques d'origine alimentaire qu'à celle accordée aux produits pharmaceutiques. À l'instar des médicaments, nombre de ceux-ci agissent sur des étapes clés de la cancérogenèse, telles : le processus d'inflammation, l'autosuffisance en facteurs de croissance, l'insensibilité aux antifacteurs de croissance, l'évasion de la mort programmée de la cellule (apoptose), l'acquisition d'un potentiel de réplication illimité, une angiogenèse soutenue et l'invasion des tissus et la formation de métastases (Aggarwal et Shishodia, 2006 ; de Kok, van Breda et Manson, 2008). Dans certains cas, la même molécule agit sur plusieurs de ces aspects telle l'(-)-épigallocatechine gallate ou EGCG, une catéchine du thé vert qui possède entre autres des propriétés anti-inflammatoires, pro-apoptotiques, antiangiogéniques et antimétastatiques (Khan *et al.*, 2006). D'autres aliments comprennent plusieurs molécules inhibant différentes voies de la cancérogenèse, tel le brocoli qui contient en bonne quantité à la fois du sulforaphane qui possède d'excellentes propriétés pro-apoptotiques (Juge, Mithen et Traka, 2007) et de la quercétine qui possède d'excellentes propriétés antioxydantes (Boots, Haenen et Bast, 2008).

Cette pléthore d'inhibiteurs présents dans les fruits et les légumes présente plusieurs avantages recherchés par l'industrie pharmaceutique dans l'élaboration de nouveaux médicaments. En effet, la tendance actuelle dans le traitement du cancer est la prise de médicaments en petites doses de façon métronomique, afin d'optimiser les effets des drogues sur l'angiogenèse tumorale et de diminuer les effets secondaires (Kerbel et Kamen, 2004). Or, la prise quotidienne de fruits et de légumes s'apparente à cette approche puisque des centaines de composés phytochimiques d'origine alimentaire sont digérés et assimilés par les cellules de notre organisme trois fois par jour, et ce, sept jours sur sept. Certaines molécules au temps de demi-vie particulièrement long et à forte prévalence dans notre alimentation, tel la quercétine, vont même être en mesure de s'accumuler dans le sang jusqu'à des concentrations de l'ordre du micromolaire et ce, sans effets secondaires (Graefe *et al.*, 2001).



De plus, la résistance que développent certains cancers aux traitements moléculaires ciblés, telles les thérapies visant ERBB-2 dans le cancer du sein, a démontré l'importance d'une approche multi-inhibitrice afin de contourner l'émergence de résistance (Nahta *et al.*, 2006). Les fruits et les légumes ont l'avantage de fournir une vaste gamme de molécules qui, malgré leurs structures différentes, telles l'EGCG (Lamy, Gingras et Beliveau, 2002) et la delphinidine (Lamy *et al.*, 2006) sont en mesure d'inhiber une même cible, telle que le récepteur à tyrosine kinase VEGFR-2. Dans d'autres cas, une seule et unique molécule est en mesure d'inhiber des cibles complémentaires tel l'acide éllagique, qui inhibe à la fois les récepteurs à tyrosine kinase VEGFR-2 et PDGFR- $\beta$  (Labrecque *et al.*, 2005).

### 1.7 Les flavonoïdes

Les flavonoïdes, présents dans la plupart des fruits et des légumes, comptent parmi les composés phytochimiques d'importance de notre alimentation (Surh, 2003). Ces molécules appartiennent au vaste groupe des polyphénols et sont constituées de deux noyaux benzènes (A et B) connectés par un noyau pyrène contenant un oxygène (C). Les flavonoïdes possédant un groupe hydroxyle en position C-3 du noyau C sont classifiés en tant que 3-hydroxyflavonoïdes (famille comprenant les sous-classes des flavonols, anthocyanes, leucoanthocyanes et catéchines), tandis que ceux ne la possédant pas sont classifiés en tant que 3-désoxyflavonoïdes (famille comprenant les sous-classes des flavanones et flavones) (Figure 1.6). La classification à l'intérieur de ces deux familles est basée sur la présence ou non de groupes hydroxyle et méthyle additionnels ainsi que de la position où ceux-ci ont été insérés dans le squelette de base. À l'exception de ces deux familles, le noyau B des isoflavonoïdes est lié au noyau C en C-3 plutôt qu'en C-2, faisant des isoflavonoïdes une catégorie à part. Il est intéressant de souligner que les anthocyanes et les catéchines ne possèdent pas de groupement carbonyle en position C-4 (Erlund, 2004).



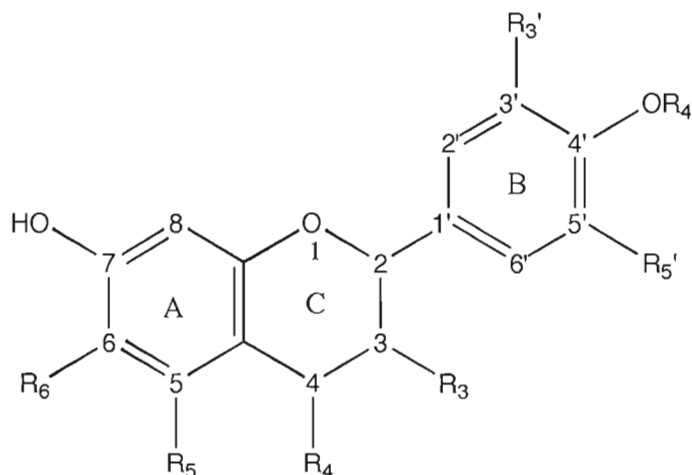


Figure 1.6 : Structure de base des flavonoïdes.

Majoritairement présents dans les plantes sous forme glycosylée, les flavonoïdes sont rarement retrouvés sous la forme aglycone (exempte d'un groupement saccharide). Au moins huit types de monosaccharides ou combinaisons de ceux-ci (disaccharides ou trisaccharides) peuvent se lier aux différents groupes hydroxyles libres sous la forme aglycone des flavonoïdes. Ces combinaisons ont pour conséquence la création d'une très grande possibilité de flavonoïdes. Généralement, les glycosides se retrouvent sous la forme O-glycosilée où le sucre (dont les plus communs sont le d-glucose et le l-rhamnose) est lié au groupement hydroxyle en position C-3 ou C-7 (Erlund, 2004).

Les différents composés flavonoïdes sont reconnus comme des inhibiteurs particulièrement efficaces d'une vaste gamme de récepteurs à tyrosine kinase dont ERBB-1 (Sah *et al.*, 2004), ERBB-2 (Pianetti *et al.*, 2002), PDGFR- $\beta$  (Chen et Zhang, 2003), Met (Bigelow et Cardelli, 2006), le « insulin-like growth factor receptor I » ou IGFR-I (Adhami *et al.*, 2004) ou encore VEGFR-2 (Lamy, Gingras et Beliveau, 2002) à la fois *in vitro* ou *in vivo*, soulignant que ces composés pourraient jouer un rôle important dans la prévention du cancer (Surh, 2003). Parmi ceux-ci, les anthocyanes et les flavonols sont des sous-classes particulièrement intéressantes.

### 1.7.1 Les anthocyanes

Les anthocyanes (anthocyanidines lorsque sous forme glycosylée) sont un groupe de molécules solubles dans l'eau, auquel on attribue la pigmentation rouge, bleu ou encore violet de plusieurs fruits tels que les aubergines, les pruneaux, les pommes et plusieurs types de baies (Erlund, 2004). Les proanthocyanidines diffèrent des autres composés phénoliques de par leur structure polymérisée qui, sous des conditions acides à température élevée, se retrouvent sous la forme d'anthocyanidines (Nichenametla *et al.*, 2006). Jusqu'à maintenant, on a relevé plus de 300 différents anthocyanes et anthocyanidines d'origine végétale, dont les plus connus sont la cyanidine, la delphinidine, la pétunidine, la pélargonidine, la péonidine et la malvidine (Figure 1.7) (Parkinson et Brown, 1981).

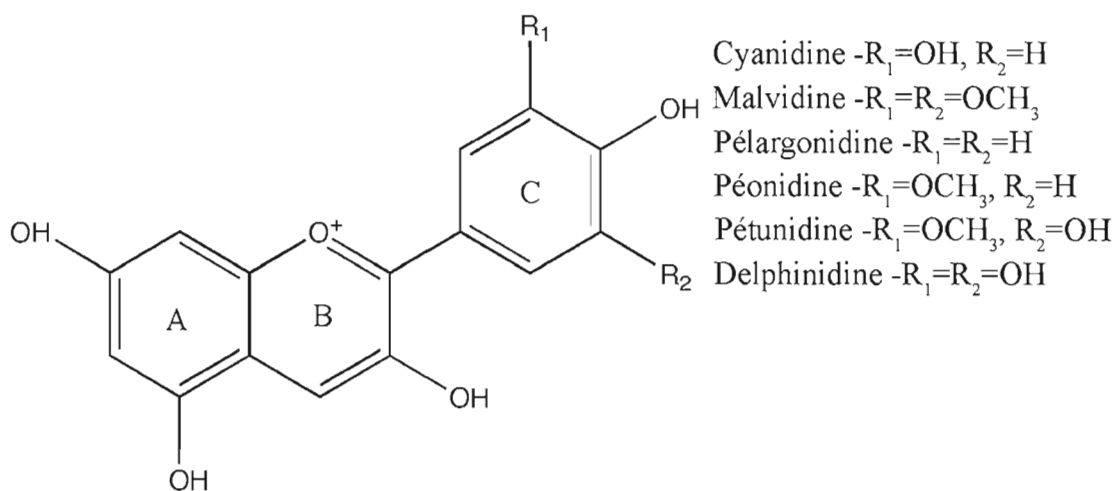


Figure 1.7 : Structure des principaux anthocyanes.

Récemment, certaines études ont démontré que les anthocyanes possédaient un bon potentiel dans la prévention du cancer (Aggarwal et Shishodia, 2006 ; Hou, 2003). Ainsi, les anthocyanes extraits de pépins de raisins ont inhibé le processus de promotion tumorale chez la souris (Bomser *et al.*, 1996), tandis que des extraits de baies riches en anthocyanes ont démontré un potentiel antioxydant et antiangiogénique (Bagchi *et al.*, 2004). Au sein de notre laboratoire, nous avons également démontré que la delphinidine inhibe le potentiel invasif des glioblastomes par la neutralisation du système plasminolytique (Lamy *et al.*, 2007), et

qu'elle est également un inhibiteur puissant de l'angiogenèse *in vitro* et *in vivo* par l'inhibition de la phosphorylation de VEGFR-2 (Lamy *et al.*, 2006).

### 1.7.2 Les flavonols

Flavonoïdes les plus répandus dans la diète, les flavonols sont reconnus pour leurs propriétés anticancéreuses ainsi que leur vaste gamme d'effets biologiques et pharmacologiques (Middleton, Kandaswami et Theoharides, 2000). Les représentants principaux sont le kaempferol, la myricétine et la quercétine (Figure 1.8), cette dernière étant la plus abondante des bioflavonoïdes, étant présente en bonne quantité dans les aliments d'origine végétale tels que les oignons, les pommes, le thé, le brocoli et le vin rouge (Scalbert et Williamson, 2000). La quercétine peut également être retrouvée sous forme glycosylée, par exemple en tant que quercitrin (quercétine-3-O- $\alpha$ -rhamnoside) (Figure 1.8) ou que rutin (quercétine-3-rhamnoglucoside), cette dernière forme étant la plus répandue. Tout dépendant de la source, la quercétine peut se retrouver sous la forme d'un glucoside (oignons), d'un galactoside (pommes) ou encore d'un arabinoside (baies) (Erlund, 2004). Des 20 à 35 mg de flavonols ingérés quotidiennement dans notre diète (Manach *et al.*, 2005), près de 16 mg sont de la quercétine (quantité exprimée sous forme aglycone) (Hertog *et al.*, 1993).

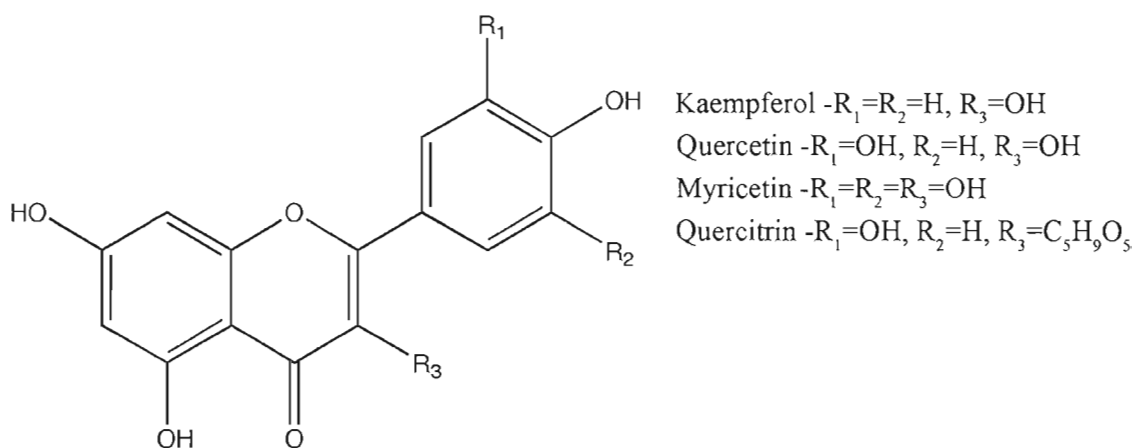


Figure 1.8 : Structure des principaux flavonols.

Une large étude épidémiologique réalisée en Finlande a démontré une association entre une faible incidence de cancer du sein et du poumon chez les individus ayant une consommation élevée en quercétine, et une faible incidence de cancer de la prostate chez ceux consommant beaucoup de myricétine (Knekt *et al.*, 2002). Quelques études cliniques ont démontré des effets anticancéreux de la quercétine sur les cancers du sein, du poumon et de la prostate (Nichenametla *et al.*, 2006). Une étude clinique de type cas-témoin, effectuée en Espagne, a également démontré qu'une forte consommation en quercétine et en kaempferol corrèle avec une incidence plus faible de cancer gastrique (Garcia-Closas *et al.*, 1999). Malgré que la quercétine ait probablement été l'un des premiers inhibiteurs à tyrosine kinase à avoir été décrit (Glossmann, Presek et Eigenbrodt, 1981), les mécanismes d'action en cause dans la prévention du cancer par la quercétine et les autres flavonols sont généralement liés au potentiel antioxydant de ceux-ci ou encore à leur effet sur le cycle, la croissance et la mort cellulaire (Murakami, Ashida et Terao, 2008 ; Nichenametla *et al.*, 2006).

## 1.8 Les objectifs de la recherche

L'angiogenèse tumorale et les processus liés à la formation des métastases sont deux aspects importants du développement des médulloblastomes, tumeurs pédiatriques hautement agressives. Ces étapes clés de la cancérogenèse sont actuellement des cibles privilégiées dans le développement de nouveaux traitements pour la guérison des médulloblastomes. L'accumulation des données concernant le lien entre le développement du cancer et l'alimentation a permis d'établir que près du tiers des cancers pouvaient être prévenus par cette dernière et ce, sans effets secondaires indésirables. Bien que de nombreux mécanismes encore peu compris soient en cause, les flavonoïdes, grâce à leur action inhibitrice envers de nombreux récepteurs à tyrosine kinase, représentent des molécules d'importance. C'est dans ce contexte que nous avons tenté d'identifier des propriétés antiangiogéniques et antimétastatiques à certains flavonoïdes pouvant être utilisés dans la prévention des médulloblastomes.

Dans un contexte de thérapie antiangiogénique, le récepteur à tyrosine kinase PDGFR- $\beta$  est une cible cruciale puisqu'en complément de VEGFR-2, il permet la stabilisation et la maturation des nouveaux capillaires sanguins. PDGFR- $\beta$  est également une cible intéressante dans le traitement des médulloblastomes puisque ce récepteur est hautement exprimé dans les tumeurs au fort potentiel métastatique. Même si d'autres polyphénols, tels le resvératrol (Godichaud *et al.*, 2006), l'acide éllagique (Labrecque *et al.*, 2005) ou l'EGCG (Chen et Zhang, 2003) inhibent le récepteur PDGFR- $\beta$ , actuellement aucune donnée n'indique un effet des anthocyanes sur la signalisation de ce récepteur. Dans cette première étude, nous avons donc vérifié, le potentiel de différents anthocyanes (cyanidine, delphinidine, pélagonidine et pétunidine) ainsi que d'un extrait de baies riches en anthocyanes sur :

- la phosphorylation de PDGFR- $\beta$  et la signalisation induite par le PDGF-BB;
- la prolifération et la migration des cellules musculaires lisses;
- la formation de tube dans un système de coculture (cellules endothéliales et musculaires lisses) en trois dimensions;
- l'angiogenèse tumorale dans une matrice de Matrigel implantée chez la souris;
- la croissance tumorale en xénogreffe chez des souris gavées avec un extrait de baies.

Dans un contexte de thérapie antimétastatique, le récepteur à tyrosine kinase Met est une cible importante, dû à son rôle dans la migration et l'invasion cellulaire menant à la formation de métastases. De plus, Met s'est avéré être une voie compensatoire dans le cadre de thérapies moléculaires antimétastatiques ayant pour cible la famille ERBB. Récemment, la découverte d'un rôle important de la voie de signalisation HGF/Met dans les médulloblastomes souligne que Met, en complément de ERBB-2, exprimé dans plus de 80 % des cas de ce cancer pédiatrique, est également une cible à privilégier. Malgré que plusieurs études aient suggéré un potentiel important des flavonoïdes sur la voie de signalisation HGF/Met (Bigelow et Cardelli, 2006 ; Lee *et al.*, 2006 ; Lee *et al.*, 2008), l'impact des flavonols sur cette dernière demeure largement inconnu. Dans cette seconde étude, nous

avons vérifié le potentiel de différents flavonols (quercétine, myricétine, kaempferol et quercitrin) sur :

- la phosphorylation de Met induite par HGF;
- la signalisation intracellulaire induite par Met;
- la migration de cellules de médulloblastomes;
- les changements morphologiques induits par le HGF.

## CHAPITRE II

### DELPHINIDIN, A DIETARY ANTHOCYANIDIN, INHIBITS PLATELET DERIVED GROWTH FACTOR LIGAND/RECEPTOR (PDGF/PDGFR) SIGNALING

Sylvie Lamy<sup>1</sup>, Édith Beaulieu<sup>1</sup>, David Labbé<sup>1</sup>, Valérie Bédard<sup>1</sup>, Albert Moghrabi<sup>2</sup>, Stéphane Barrette<sup>2</sup>, Denis Gingras<sup>1</sup> and Richard Béliveau<sup>1,2\*</sup>

<sup>1</sup>Laboratoire de Médecine Moléculaire, Hôpital Ste-Justine-Université du Québec à Montréal and <sup>2</sup>Service d'hématologie-oncologie, Centre de Cancérologie Charles-Bruneau, Hôpital Ste-Justine, 3175 Côte-Ste-Catherine, Montréal, Québec, Canada, H3T 1C5

\* To whom correspondence should be addressed at: Laboratoire de Médecine Moléculaire, Centre de Cancérologie Charles-Bruneau, Hôpital Ste-Justine, 3175 Côte Ste-Catherine, Montréal, Québec, Canada H3T 1C5

Email: [molmed@recherche-ste-justine.qc.ca](mailto:molmed@recherche-ste-justine.qc.ca)

**Grant sponsor:** The Cancer Research Society (to R.B.);

**Grant number:** 10019.

**Abbreviations:** **Cy**, cyanidin; **Dp**, delphinidin; **EC**, endothelial cell; **ERK**, extracellular signal-regulated kinase; **HUVEC**, human umbilical vein endothelial cell; **FGF-2**, fibroblast growth factor-2; **FITC**, fluorescein isothiocyanate; **PASMC**, human pulmonary aortic smooth muscle cell; **PDGF**, platelet-derived growth factor; **PDGFR- $\beta$** , platelet-derived growth factor  $\beta$ -receptor; **Pg**, pelargonidin; **Pt**, petunidin; **VEGF**, vascular endothelial growth factor; **VEGFR-2**, vascular endothelial growth factor receptor-2.

## Abstract

Most cancers are dependent on the growth of tumor blood vessels and inhibition of tumor angiogenesis may thus provide an efficient strategy to retard or block tumor growth. Recently, tumor vascular targeting has expanded to include not only endothelial cells (EC), but also the smooth muscle cells (SMC) which contribute to a mature and functional vasculature. We have previously reported that delphinidin, a major biologically active constituent of berries, inhibits the vascular endothelial growth factor (VEGF)-induced phosphorylation of VEGF receptor-2 (VEGFR-2) and blocks angiogenesis *in vitro* and *in vivo*. In the present study, we show that delphinidin also inhibits activation of the platelet derived growth factor-BB (PDGF-BB) receptor- $\beta$  (PDGFR- $\beta$ ) in SMC and that this inhibition may contribute to its antitumor effect. The inhibitory effect of delphinidin on PDGFR- $\beta$  was very rapid and led to the inhibition of PDGF-BB-induced activation of ERK-1/2 signaling and of the chemotactic motility of SMC, as well as the differentiation and stabilization of EC and SMC into capillary-like tubular structures in a 3D co-culture system. Using an anthocyan-rich extract of berries, we show that berry extracts were able to suppress the synergistic induction of vessel formation by basic fibroblast growth factor-2 and PDGF-BB in the mouse Matrigel plug assay. Oral administration of the berry extract also significantly retarded tumor growth in a lung carcinoma xenograft model. Taken together, these results provide new insight into the molecular mechanisms underlying the antiangiogenic activity of delphinidin that will be helpful for the development of dietary-based chemopreventive strategies.



## 2.1 Introduction

The concept of treating tumors by interfering with their vascularization is based on the premise that tumor growth is dependent on angiogenesis and that tumor progression is suppressed if neovascularization is prevented (Folkman, 1995). When first conceived, antiangiogenic therapy for cancer offered the possibility of universal efficacy, low toxicity, and little possibility of resistance (Folkman, 1999). Vascular endothelial growth factor (VEGF) has been shown to be the central positive regulator of tumor angiogenesis and, therefore, has become the primary target when exploiting antiangiogenic strategies. Blockade of the VEGF pathway has yielded promising results both in animal models and in patients (Homsí et al., 2007). Although interference with VEGF-mediated signaling events is effective in preventing the early growth of neovessels, mature vessels from established tumors are largely resistant to inhibitors directed against either VEGF or its receptor VEGFR-2 (Bergers *et al.*, 2003). These mature vessels are surrounded by periendothelial cells, such as pericytes and smooth muscle cells (SMC), and the contact between these cells stabilizes new blood vessels and promotes endothelial cell survival (Carmeliet, 2000). This resistance to VEGF blockade is associated with increased expression of angiogenic factors, such as platelet-derived growth factor (PDGF-BB) and angiopoietin-1 (Ang-1), which may contribute to vessel stabilization (Glade Bender *et al.*, 2004). Recent advances in analysis of the mechanisms of vessel maturation indicate that interference with PDGF-BB/PDGFR- $\beta$  signaling results in disruption of already established endothelial/periendothelial associations and leads to vessel destabilization (Benjamin, Hemo et al., 1998). SMC are recruited by PDGF-BB-expressing EC to remodel, stabilize and mature new vessels (Gerhardt et al., 2003 ; Hellstrom *et al.*, 1999). One way to reduce SMC coverage of vessels is to block the signaling pathways involved in recruiting SMC to EC, and the PDGF-BB/PDGFR- $\beta$  system has been shown to be a crucial player in this recruitment (Gerhardt et al., 2003). Accordingly, blocking PDGFR signaling in a transgenic mouse model of pancreatic islet carcinogenesis (Rip1Tag2) with the receptor tyrosine kinase inhibitor SU6668 caused regression of blood vessels, which was due to the detachment of SMC from tumor vessels, and thereby restricted tumor growth (Bergers *et al.*, 2003). Moreover, *Pdgfb* and *Pdgfrb*

knockout experiments have suggested a critical role for PDGF signaling in the establishment of functional blood vessels by recruiting stabilizing vascular mural cells to the developing blood vessel (von Tell, Armulik et Betsholtz, 2006). In addition, SMC that surround tumor vessels produce VEGF (Brown *et al.*, 2001 ; Fukumura *et al.*, 1998), and tumor vessels lacking SMC are more dependent on VEGF for their survival than are vessels associated with SMC (Benjamin *et al.*, 1999). The importance of this system for the maintenance of tumor vessels was also illustrated by the observation that the combined inhibition of VEGF and PDGF receptors by kinase inhibitors caused the regression of established tumors (Bergers *et al.*, 2003 ; Erber *et al.*, 2004 ; Laird *et al.*, 2000). Taken together, these studies highlight the need to identify novel molecules that inhibit both VEGF and PDGF receptor activities.

There is currently increasing interest in the anticancer properties of naturally occurring molecules found in the diet (Surh, 2003). Epidemiologic studies have shown that a diet rich in fruits and vegetables has a beneficial, preventive effect against cancer (Block, Patterson et Subar, 1992 ; Greenwald, Clifford et Milner, 2001). The mechanisms responsible for these beneficial effects seem to be related to the high content, in several fruits and vegetables, of phytochemicals such as isothiocyanates, allyl sulfides and polyphenols (Aggarwal et Shishodia, 2006 ; Bravo, 1998 ; Stoclet *et al.*, 2004). During the last decade, the polyphenols found in grapes, wine, green tea and various fruits have received significant attention for their strong antioxidant properties but there is now convincing evidence that these molecules also inhibit key processes associated with both tumor growth and angiogenesis (Demeule *et al.*, 2005). We and others have previously shown that polyphenols such as resveratrol, ellagic acid and green tea polyphenol epigallocatechin-3-gallate inhibit PDGFR autophosphorylation (Ahn *et al.*, 1999 ; Chen et Zhang, 2003 ; Godichaud *et al.*, 2006 ; Labrecque *et al.*, 2005 ; Liang *et al.*, 1997 ; Masamune *et al.*, 2005 ; Masamune *et al.*, 2005 ; Sachinidis *et al.*, 2000 ; Sakata *et al.*, 2004). Moreover, recent studies have shown that anthocyanins (i.e. anthocyanins and their aglycones the anthocyanidins), a class of polyphenols present at high levels in fruits, also act as potential cancer chemopreventive agents (Aggarwal et Shishodia, 2006 ; Bagchi *et al.*, 2004 ; Bomser *et al.*, 1999 ; Hou, 2003). In this respect, we have shown that delphinidin is a strong inhibitor of *in vitro* and *in vivo* angiogenesis through inhibition of VEGFR activities (Lamy *et al.*, 2006) and also by inhibiting the invasiveness of

glioblastoma through interference with the plasminolytic system (Lamy *et al.*, 2007).

In this study, we present evidence that the antiangiogenic and antitumor properties of delphinidin may also involve inhibition of PDGFR activities, leading to an inhibition of PDGF-induced SMC migration as well as to an inhibition of the morphogenic differentiation of EC and SMC into capillary-like structures in a co-culture model. Moreover, an anthocyan-rich extract markedly inhibited the effects of a combination of fibroblast growth factor-2 (FGF-2) and PDGF-BB in the induction of new blood vessel formation in *in vivo* Matrigel plug assays and inhibited human lung cancer cell growth in NCI-H460 xenograft model. These results suggest that delphinidin seems to act as a multifunctional anticancer agent through its inhibitory effects on several aspects of both tumor growth and tumor angiogenesis.

## 2.2 Materials and methods

### 2.2.1 Materials

Cell culture media were obtained from Life Technologies (Burlington, ON) and serum was purchased from HyClone Laboratories (Logan, UT). Cyanidin, delphinidin, pelargonidin and petunidin were obtained from Polyphenols Laboratories AS (Sandnes, Norway). The anthocyan-rich combination of berry extract, OptiBerry BX-600 (Lot no. 0502005, InterHealth Nutraceuticals, Benecia, CA), used in this study is a standardised blend of various berries, including wild blueberry (*Vaccinium angustifolium*), strawberry (*Fragaria chiloensis*), wild bilberry (*Vaccinium myrtillus*), elderberry (*Sambucus nigra*), cranberry (*Vaccinium macrocarpon*) and raspberry (*Rubus idaeus*). Electrophoresis reagents were purchased from Bio-Rad (Mississauga, ON). Protein A-Sepharose and Protein G-Sepharose were obtained from Amersham Pharmacia Biotech (Baie d'Urfé, QC). The anti-PDGFR- $\beta$  (958), -VEGFR-2 (C-1158) and -ERK-1/2 (extracellular-signal-regulated kinase 1 and 2) (K-23) polyclonal antibodies and the anti-phosphotyrosine (PY99) monoclonal antibody were from Santa Cruz Biotechnologies (Santa Cruz, CA). Anti-phospho-p44/42 MAPK (Thr 202/Tyr 204) polyclonal antibodies were from Cell Signaling Technology (Beverly, MA). Anti-mouse and anti-rabbit horseradish peroxidase-linked secondary antibodies were purchased from Jackson ImmunoResearch Laboratories (West Grove, PA) and enhanced chemiluminescence (ECL) reagents were from PerkinElmer Life Sciences (Boston, MA). Human recombinant FGF-2 was obtained from Upstate Biotechnology (Lake Placid, NY). Human recombinant PDGF-BB was obtained from R&D Systems (Minneapolis, MN). Human recombinant VEGF (isoform 165) was produced and purified as described (Labrecque *et al.*, 2005). Gleevec (Imatinib mesylate, STI571) was from Novartis Pharmaceutical Inc. (Basel, Switzerland). Plasminogen-depleted human plasma fibrinogen and human plasma thrombin were obtained from Calbiochem (La Jolla, CA). Micro bicinchoninic acid protein assay reagents were from Pierce (Rockford, IL). All other reagents were from Sigma-Aldrich Canada.

### ***2.2.2 Cell culture***

Human umbilical vein endothelial cells (HUVEC) and pulmonary aortic smooth muscle cells (PASMC) were purchased from Clonetics (San Diego, CA) and maintained in EC basal medium-2 (EBM-2) supplemented with EGM-2 MV growth factor mixture (Clonetics) and smooth muscle medium-2 (SmGM-2; Clonetics), respectively. Human large lung carcinoma cell line (NCI-H460) was purchased from the American Type Culture Collection (Manassas, VA) and maintained in RPMI 1640 medium supplemented with 1 mM sodium pyruvate, 2.5 g/L D-glucose and 10 mM HEPES, and containing 10% fetal bovine serum (FBS), 100 units/mL penicillin and 100 µg/mL streptomycin. The cells were cultured at 37°C under a humidified 95%-5% (v/v) mixture of air and CO<sub>2</sub>. For experimental purposes, HUVEC and PASMC were grown to confluence before overnight serum starvation without supplements. Cells were treated with vehicle or with anthocyanidin diluted in 100% EtOH, and stimulated with VEGF or PDGF-BB.

### ***2.2.3 Immunoprecipitation and immunoblotting procedures***

After treatment with PDGF-BB (50 ng/mL, 5 min), PASMC were washed once with ice-cold PBS (pH 7.4) containing 1 mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub> and were incubated in the same medium for 1 h at 4°C. The cells were solubilized on ice in lysis buffer [150 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl, pH 7.4, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 0.5% (v/v) Nonidet P-40, 1% (v/v) Triton X-100] containing 1 mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>. The cells were then scraped from the culture dishes and the resulting lysates were clarified by centrifugation at 10,000g for 10 min. Protein concentrations were determined using the micro bicinchoninic acid (BCA) method. For immunoprecipitation studies, lysates were clarified by a 1 h incubation at 4°C with a mixture of Protein A/Protein G-Sepharose beads. After removal of the Sepharose beads by low-speed centrifugation, identical amounts of protein (200 µg) from each sample were transferred to fresh tubes and incubated in lysis buffer overnight at 4°C in the presence of 1 µg/mL of anti-PDGFR-β. Immunocomplexes were collected by incubating the mixture with 25 µL (50% suspension) of Protein A- (rabbit primary antibody) Sepharose beads for 2 h. Non-specifically bound proteins were removed by washing the beads three times with lysis buffer and once with PBS containing 1 mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>. The proteins were extracted with two-fold concentrated Laemmli sample buffer [125 mM Tris-HCl (pH 6.8), 20% glycerol, 4% SDS,

10%  $\beta$ -mercaptoethanol, and 0.00125% bromphenol blue], boiled 4 min, and resolved by sodium dodecylsulphate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE; 7.5% gel). The proteins were transferred onto polyvinylidene difluoride (PVDF) membranes, blocked overnight at 4°C in Tris-buffered saline/Tween 20 [147 mM NaCl, 20 mM Tris/HCl, pH 7.5, and 0.1% Tween 20] containing 2% (w/v) bovine serum albumin and probed with primary antibodies (PY99 or PDGFR- $\beta$ ) for 2 h at room temperature. Immunoreactive bands were revealed after a 1 h incubation with horseradish peroxidase-conjugated anti-mouse IgG, and the signals were visualized by enhanced chemiluminescence. The immunoreactive bands were quantified by scanning densitometry (Molecular Dynamics). VEGF-dependent phosphorylation of VEGFR-2 was monitored as described (Lamy *et al.*, 2006).

#### **2.2.4 Analysis of ERK-1/2 phosphorylation**

PASMC treated with vehicle or with delphinidin for 18 h were stimulated with 50 ng/mL PDGF-BB for 5 min and then washed, incubated in PBS containing 1 mM each of NaF and  $\text{Na}_3\text{VO}_4$  and solubilized on ice in lysis buffer [150 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl, pH 7.4, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 1 mM NaF, 1 mM  $\text{Na}_3\text{VO}_4$ , 0.5% (v/v) Nonidet P-40, and 1% (v/v) Triton X-100] as described previously. Lysates (20  $\mu\text{g}$ ) were solubilized in Laemmli sample buffer, boiled for 4 min and resolved by SDS-PAGE (10% gel). The proteins were transferred onto PVDF membranes, blocked overnight at 4°C with TBS-Tween-20 containing 2% BSA and incubated 1 h at room temperature with primary antibodies (pERK or ERK). Immunoreactive bands were revealed after 1 h incubation with HRP-conjugated anti-rabbit antibodies and the signals were visualized with an ECL detection system.

#### **2.2.5 Migration assays**

Transwells (8  $\mu\text{m}$  pore size; Costar, Cambridge, MA) were precoated with 0.15% gelatin in PBS by adding 600/100  $\mu\text{L}$  in the lower/upper chambers for 24 h at 4°C. The Transwells were then washed with PBS and assembled into 24-well plates. The upper chamber of each Transwell was filled with 50  $\mu\text{L}$  of cells ( $1.0 \times 10^6$  cells/mL) and PASMC were allowed to adhere for 30 min. The monolayers were then treated for 2 h by adding 50  $\mu\text{L}$  of 2-fold concentrated inhibitor (delphinidin, Gleevec or berry extract) solution prepared in serum-free medium into the upper chamber and 600  $\mu\text{L}$  of the compound solution (1 $\times$ ) into the lower

chamber. After 2 h, PDGF-BB (10 ng/mL) was added to the lower chamber as a chemoattractant. The plate was placed at 37°C in 5% CO<sub>2</sub>/95% air for another 3 h. Cells that had migrated to the lower surface of the filters were fixed with 10% formalin phosphate and stained with 0.1% Crystal Violet/20% (v/v) methanol. The migration was quantitated using computer-assisted imaging (Northern Eclipse software; Empix Imaging, Mississauga, ON) and data are expressed as the average density of migrated cells per four fields (magnification ×50).

#### ***2.2.6 Cell proliferation assays***

Cells were plated in 96-well plates at 2500-5000 cells/well in 200 µl complete medium and incubated at 37°C under a humidified atmosphere containing 5% CO<sub>2</sub> for 24 h. The next day, the medium was removed and replaced by 100 µl fresh medium containing 1 % FBS and the indicated concentrations of delphinidin or berry extract. Cell viability was determined by assaying the mitochondrial activity of treated cells after a 72 h incubation, with the highly sensitive WST-1 assay. Briefly, 10 µl of tetrazolium salt WST-1 reagent (Roche) was added to each well and the soluble formazan dye produced by metabolically active cells was monitored every minute for 30 min at 37°C on a SpectraMax Plus reader (Molecular Devices).

#### ***2.2.7 Assessment of cell viability***

Cell viability was determined by the Trypan blue exclusion assay. Briefly, cells were treated with 25 µM delphinidin and incubated in a humidified atmosphere of 5% CO<sub>2</sub> in air at 37°C in SmGM-2 medium for 18 h. After cell detachment using trypsin-EDTA, an equal volume of 0.4 % Trypan Blue Stain (Gibco BRL, Burlington, ON) was added to the cell suspension and the proportion of viable cells was evaluated under the field microscope. About 100 cells were counted and cells stained dark blue were not considered viable.

#### ***2.2.8 Capillary tube formation by EC/SMC in fibrin gels***

HUVEC and PASMC were embedded within fibrin gels by the following procedure. 250 µL of 2.5 mg/mL human fibrinogen solution (made in serum-free medium) was mixed with 0.5 U/mL of human thrombin (0.5 U/mL) and the solution was quickly pipetted into the wells of

24-well plates (covering the entire surface of the wells) and allow to clot at 37°C for 30 min. HUVEC ( $2.5 \times 10^5$  cells/mL) and PASM (C) ( $1.0 \times 10^5$  cells/mL), suspended in serum-free EC basal medium containing vehicle or delphinidin, were seeded onto each fibrin gel. After 24 h, cells had spread to form a confluent monolayer. The same procedure was used to generate a second fibrin gel overlying the apical surface of the cells. This fibrin gel was allowed to polymerize for 30 min at 37°C and 1 mL aliquots of fresh serum-free EC basal medium supplemented with FGF-2/VEGF or PDGF-BB/VEGF (50 ng/mL) and containing (or lacking) delphinidin, were then added to each well. After 24 h, the cultures were photographed ( $\times 50$ ) using a Retiga 1300 camera and a Zeiss Axiovert S100 microscope, and the length of the capillary network was quantified with a map scale calculator.

#### ***2.2.9 Capillary tube stabilization by EC/SMC in fibrin gels***

HUVEC and PASM (C) were embedded within fibrin gels as described above and formation of tubular structures was induced using FGF-2/VEGF (50 ng/mL) for 4 days. After 2 days of treatment with growth factors, delphinidin or Gleevec were added daily for 2 days. The cultures were photographed ( $\times 50$ ) at days 4, 5 and 6 using a Retiga 1300 camera and a Zeiss Axiovert S100 microscope, and the length of the capillary network was quantified with a map scale calculator.

#### ***2.2.10 Animals***

Female nude mice (Crl:CD-1<sup>®</sup>-Foxn1<sup>nu</sup>; 20–25 g, 6 weeks of age) (Charles River Laboratories, St-Constant, QC) were housed in cover-top filter cages and placed in a HEPA filtered horizontal laminar flow station. Caging equipment with which mice had contact was autoclaved prior to use and mice had *ad libitum* access to food and autoclaved water. The experimental protocols were approved by the Institutional Animal Care and Use Committee of Ste-Justine Hospital prior to animal use and mice were kept in accordance with the guidelines of the Canadian Council on Animal Care. All procedures were performed under sterile conditions in a vertical laminar flow hood. For Matrigel and cell injections, the mice were anesthetized by inhalation with isoflurane (2%/1L O<sub>2</sub>).



### **2.2.11 *In vivo* Matrigel plug assay**

The Matrigel plug assay is based on the method of Passaniti (Passaniti *et al.*, 1992) with modifications. Briefly, immunodeficient mice were treated by injection s.c. into the ventral midline region of the right flank with 0.5 mL of phenol red-free Matrigel (BD Bioscience, Mississauga, ON) containing berry extracts (500-1000 µg/mL), FGF-2 (250 ng/mL), PDGF-BB (250 ng/mL) and heparin (0.0025 units/mL). Control mice were injected with Matrigel without FGF-2/PDGF-BB. Matrigel containing ethanol alone was injected into some animals to serve as baseline controls. At the end of the study (day 7), some mice were injected through the tail vein with 200 µL of high molecular weight (2,000,000 MW) fluorescein isothiocyanate (FITC)-labeled dextran to visualize blood vessels within the plugs. Mice were sacrificed 10 min after injection, and Matrigel plugs were harvested, washed with PBS and photographed with a digital Nikon Coolpix™ 5000 camera (Nikon Canada, Mississauga, ON). Matrigel plugs were then fixed in 10% formalin and photographs of blood vessels within Matrigel implants were obtained using a microscope with a fluorescent light source (Zeiss-Axiovert 100).

### **2.2.12 *NCI-H460 tumor xenograft model***

Mice were s.c. inoculated with NCI-H460 lung carcinoma ( $2.5 \times 10^6$  cells in 0.1 mL 1% methylcellulose/modified Eagle's medium/1 mM sodium pyruvate) into the right flank of the mice. Two days before cell inoculation, the animals were treated orally by gavage with berry extracts diluted in autoclaved water (5 mg/mouse/day). Tumor volumes were measured daily with calipers and tumor volumes were calculated using the following formula: tumor volume ( $\text{mm}^3$ ) =  $a \times b^2 \times 0.52$ , where  $a$  is the longest diameter,  $b$  is the shortest diameter, and 0.52 is a constant to calculate the volume of an ellipsoid. All mice were sacrificed when the first mouse of the control group reached an average volume of 1000  $\text{mm}^3$ . Experiments were performed on 6 animals for each group.

### **2.2.13 *Statistical analysis***

The data are presented as means  $\pm$  SEM and statistical analyses were performed with Student's *t* test when one group was compared with the control group. Statistical comparisons between groups were performed using one-way analysis of variance (ANOVA) followed by

Tukey's test. In the xenograft study, statistical significance of difference between control and berry extracts group was determined by one-way ANOVA followed by Bonferroni *t* test.

## 2.3 Results

### 2.3.1 Delphinidin inhibits PDGF-induced tyrosine phosphorylation of PDGFR- $\beta$

As we previously demonstrated (Lamy *et al.*, 2006), delphinidin inhibited VEGF-induced tyrosine phosphorylation of VEGFR-2 in HUVEC (Figure 2.1A). To evaluate whether delphinidin could also inhibit the phosphorylation of another tyrosine receptor involved in angiogenesis, PDGFR- $\beta$ , we examined the effect of delphinidin on PDGF-BB-induced phosphorylation of this receptor. Quiescent PASMCM were incubated for 18 h in serum-free medium in the presence or absence of 25  $\mu$ M delphinidin. The cells were then stimulated with 50 ng/mL PDGF-BB for 5 min and the phosphorylation state of PDGFR- $\beta$  was assessed by immunoprecipitation of the receptor, followed by Tyr(P) immunodetection. Under these experimental conditions, we observed that delphinidin dramatically reduced the phosphorylation of PDGFR- $\beta$  induced by PDGF-BB (Figure 2.1B, *top panel*), an effect similar to the inhibition of the tyrosine phosphorylation of VEGFR-2 (Figure 2.1A, *top panel*). Blotting of the membranes with an antibody directed against PDGFR- $\beta$  showed that delphinidin did not affect the amount of this receptor in the immunoprecipitate (Figure 2.1B, *bottom panel*). Moreover, among the anthocyanidins tested, we observed that delphinidin is the most potent inhibitor (Figure 2.1C, *top panel*). Interestingly, the inhibition of tyrosine phosphorylation of PDGFR- $\beta$  by 25  $\mu$ M delphinidin was very rapid, being observed as early as 1 min following the addition of the molecule and was already complete at 5 min (Figure 2.1D, *top panel*). As shown in Figure 2.1E (*top panel*), the inhibition of PDGF-induced tyrosine phosphorylation of PDGFR- $\beta$  by delphinidin was dose-dependent, with an  $IC_{50}$  around 10  $\mu$ M.

### 2.3.2 Delphinidin inhibits PDGF-induced ERK phosphorylation

In order to investigate whether the inhibition of PDGFR- $\beta$  tyrosine phosphorylation by delphinidin also results in the inhibition of downstream intracellular signaling events, we examined the effect of delphinidin on the PDGF-BB-induced ERK-1/2 phosphorylation, which is involved in signals induced by phosphorylation of PDGFR- $\beta$ . PASMCM were pre-treated with delphinidin for 18 h before the addition of 50 ng/mL PDGF-BB for 5 min. As

shown in Figure 2.2A (*top panel*), delphinidin inhibited the tyrosine phosphorylation of ERK-1/2 in a concentration-dependent manner, with complete inhibition at 20  $\mu$ M. Moreover, tyrosine phosphorylation of ERK-1/2 was rapidly inhibited by delphinidin after as little as 5 min of incubation and was completely abolished at 30 min (Figure 2.2B, *top panel*).

### **2.3.3 Delphinidin inhibits PDGF-induced migration of smooth muscle cells**

Numerous studies have shown that activation of MAPK, such as ERK-1/2, is important for PDGF-induced cell migration (Amagasaki *et al.*, 2006 ; Graf *et al.*, 1997 ; Huang, Jacobson et Schaller, 2004 ; Zhan *et al.*, 2003). Since delphinidin inhibited PDGF-BB-induced PDGFR- $\beta$  and ERK phosphorylation, we studied the effect of this molecule on PASMC migration. Cells were allowed to adhere to gelatin-coated Transwells and were incubated for 2 h with different concentrations of delphinidin before the addition of PDGF-BB (10 ng/mL) to the lower chamber. Under these conditions, delphinidin inhibited PDGF-BB-induced migration of PASMC in a dose-dependent manner (Figure 2.3A). We next compared the efficacy of delphinidin in inhibiting PASMC migration to that achieved with Gleevec (STI571), a drug used clinically for the treatment of chronic myeloid leukemia (Ault, 2007) and gastrointestinal stromal tumor (Rubin, Heinrich et Corless, 2007) and whose mechanism of action includes inhibition of PDGFR. For both of these two molecules, significant inhibition occurred at 5  $\mu$ M (Figure 2.3B). These results indicate that delphinidin, a naturally occurring molecule, is almost as effective as Gleevec at inhibiting PDGF-induced PASMC migration. In order to verify whether the inhibitory effect of delphinidin was not due to cytotoxicity, the impact of the molecule on cell proliferation and cell viability was measured. As shown in Fig. 2.3C and 3D, incubation of the cells for 24 h in the presence of delphinidin did not induce neither significant decrease in cell proliferation nor increased cell death compared to control cells, confirming the specific inhibitory effect of delphinidin on the phosphorylation of PDGFR- $\beta$  and ERK-1/2.

### **2.3.4 Delphinidin inhibits growth factor-induced tube formation in 3D fibrin gels**

Communication between the EC and SMC compartments appears to be essential for normal blood vessel development (Gerhardt et Betsholtz, 2003 ; Heydarkhan-Hagvall *et al.*, 2003). This type of cell-cell interaction has been explored in several static co-culture models

(Fillinger *et al.*, 1997 ; Heydarkhan-Hagvall *et al.*, 2003 ; Korff *et al.*, 2001 ; Powell *et al.*, 1998 ; van Buul-Wortelboer *et al.*, 1986). Co-cultures formed by culturing EC directly on SMC provide the best model since they replicate the spatial arrangement of cells in arteries and permit close interaction between the two cell types. Using this assay, we further investigated the antiangiogenic effects of delphinidin on vessel formation and stabilization. HUVEC and PASMC were grown together on 3D fibrin gels and addition of either FGF-2/VEGF or PDGF-BB/VEGF rapidly led to the formation of elongated tube-like structures, compared to the control (Figure 2.4). We used a combination of these growth factors because it has been reported to be effective in inducing new vessels, as compared to growth factors alone (Kano *et al.*, 2005 ; Richardson *et al.*, 2001). Before the capillary network was formed, treatment of the co-cultured cells with 12.5  $\mu$ M delphinidin resulted in a strong inhibition of the tube formation induced by both FGF-2/VEGF and PDGF-BB/VEGF compared to the stimulated controls (Figure 2.4A). Although the inhibitory effect of delphinidin towards VEGFR-2 (Lamy *et al.*, 2006) may contribute to this inhibition of tube formation, similar results were obtained when capillary structures were induced in the absence of VEGF (using either PDGF or PDGF+ FGF-2) (data not shown), suggesting that the effect of delphinidin on PDGFR also play a major role in the observed inhibition of tube formation.

In order to study the effect of delphinidin on the stabilization of vessels, the capillary networks were treated with various concentrations of delphinidin and Gleevec. In our assay, we used co-stimulation of the capillary network with FGF-2 and VEGF because the vessels formed by these growth factors are more robust and stable than those induced by the combination of PDGF-BB and VEGF. Moreover, it was recently shown that co-stimulation by VEGF and FGF-2 enhances endothelial-mural interaction through PDGF-BB/PDGFR- $\beta$  signaling in an *in vitro* model of mural cell recruitment: VEGF enhances PDGF-BB secretion by the endothelium, and FGF-2 enhances PDGFR- $\beta$  expression in SMC (Kano *et al.*, 2005). Using this combination of growth factors, we observed that higher concentrations of delphinidin and Gleevec were needed to destabilize the vessels since complete destruction of tubular structures were observed following 6 days of treatment of the co-cultures with 25  $\mu$ M Gleevec or 75  $\mu$ M delphinidin (Figure 2.4B). The observation that the destabilizing effect of Gleevec is more potent than that of delphinidin is not surprising since Gleevec is a more

potent inhibitor of PDGFR as compared to delphinidin. Nevertheless, the destabilization of vessels by delphinidin after two days of the latest treatment with the compound (day 6) suggests that the inhibitory effect of this molecule on PDGFR signaling may lead to regression of established vessels.

### ***2.3.5 Anthocyan-rich extract inhibits FGF-2 and PDGF-BB-induced angiogenesis in vivo***

Since it was reported that the combination of FGF-2 and PDGF-BB synergistically induces stable vascular networks in experimental animal models *in vivo* (Cao *et al.*, 2003), we next examined the effect of anthocyanins on vessel formation induced by these growth factors, using a Matrigel plug assay (Figure 2.5A). To this end, we used an anthocyan-rich berry extract, which is more representative of dietary intake of anthocyanins and which has potent effects *in vitro* and *in vivo* (Atalay *et al.*, 2003 ; Roy *et al.*, 2002). Matrigel plugs that contained no growth factors, FGF-2 alone, PDGF-BB alone, or a combination of FGF-2 and PDGF-BB in the presence or absence of berry extracts were injected s.c. into Crl:CD-1<sup>®</sup>-Foxn1<sup>nu</sup> mice, forming semi-solid plugs. Plugs without growth factors or with PDGF-BB had virtually no vascularization or vessel structures after 7 days (Figure 2.5A) compared with FGF-2. Plugs supplemented with a combination of FGF-2 and PDGF-BB had extensive vascularization and vessels throughout the plug. However, plugs taken from mice treated with 500 or 1000 µg/mL of berry extract had markedly reduced vascularization within the plugs (Figure 2.5A). These results were confirmed by the FITC-dextran assay, which shows that blood vessels in the control FGF-2 and PDGF-BB supplemented plugs had a well-defined branching structure indicative of a functioning capillary network (Figure 2.5B). In contrast, in plugs containing the berry extracts, the fluorescence associated with blood vessels was less intense with evidence of vascular disruption (Figure 2.5B). Since we previously reported that delphinidin impairs vessel formation in the Matrigel assay (Lamy *et al.*, 2006), this suggests that this molecule may contribute to the inhibition of neovascularization triggered by the berry extract. However, based on the reported amount of delphinidin in Optiberry (1 % w/w), a synergistic action from the various anthocyanidins present in the extract is very likely since the concentration of delphinidin in the Matrigel plugs containing the berry extract is approximately 20 times lower than in our previous study.

### ***2.3.6 Anthocyan-rich extract inhibits human tumor growth***

The *in vivo* efficacy of anthocyan-rich berry extracts against human lung carcinoma was studied using tumor xenografts in athymic mice by s.c. implantation of NCI-H460 cells, a cell line previously shown to overexpress PDGFs and their receptors (Homsí et Daud, 2007). This extract potently inhibited PDGF-dependent tyrosine phosphorylation of PDGFR- $\beta$  as well as PDGF-dependent cell migration but had no significant effect on either PASM or tumor cell proliferation (Figure 2.6A).

Oral gavage feeding of berry extracts at 200 mg/kg/day for 32 days did not induce any significant change in body weight (data not shown). Furthermore, we did not observe any adverse health effects as monitored by activity and posture of mice. At the end of the experiment, the berry extracts reduced tumor volume per mouse by 40.6% ( $731.4 \pm 299.4$  mm<sup>3</sup> in control versus  $434.1 \pm 280.2$  mm<sup>3</sup> in berry extracts-fed group; Figure 2.6B), although a time-dependent growth inhibitory effect of berry extracts on tumor growth was in evidence throughout the study. These results suggest an *in vivo* anticancer efficacy of anthocyan-rich extract in the nude mice NCI-H460 lung cancer xenograft model, without any toxicity, and that this inhibitory effect may be related, at least in part, to the inhibition of the PDGF-dependent signaling axis.

## 2.4 Discussion

The inhibition of angiogenesis as a means of preventing tumor growth has received considerable attention in recent years (Gasparini *et al.*, 2005 ; Petersen, 2007). Recently, tumor vascular targeting has been expanded to include not only EC, but also periendothelial cells or vascular mural cells, such as pericytes and SMC, which provide both survival signals and structure support to EC and contribute to a mature, functional vasculature (Carmeliet, 2003). Consequently, strategies aimed at the suppression of both VEGF- and PDGF-mediated neovessel growth are essential for efficient inhibition of tumor progression.

In this study, we show that delphinidin inhibits PDGF-BB-dependent tyrosine phosphorylation of PDGFR- $\beta$  in a dose- and time-dependent manner and that this inhibitory effect is associated with the inhibition of downstream signaling events triggered by the receptor, such as PDGF-BB-dependent phosphorylation of the p42<sup>MAPK</sup> and p44<sup>MAPK</sup> isoforms (ERK-1/2). This inhibitory effect was very rapid, being observed after only 5 min of preincubation of the cells with the molecule. Such a rapid inhibition of PDGFR was also observed for ellagic acid (Labrecque *et al.*, 2005), a polyphenol present in fruits and nuts, further emphasizing the sensitivity of PDGFR to dietary-derived polyphenols. Although the mechanisms underlying the inhibitory effect of these dietary-derived polyphenols remain to be established, previous work suggested that some of these molecules, such as epigallocatechin gallate from green tea, inhibits activation of receptor tyrosine kinase by competing with ATP for binding to the kinase domain of this receptor, resulting in impaired activation of key signaling intermediates (Li *et al.*, 2007). Since similar competitive inhibition with respect to ATP has also been observed for other polyphenols (Yang *et al.*, 2006), it is tempting to speculate that such a mechanism could also be involved in the inhibitory effect of delphinidin towards PDGFR.

Importantly, the inhibition of PDGFR by delphinidin was correlated with an inhibition of SMC migration, a crucial event in the stabilization of neovessels. Interestingly, under our experimental conditions, this inhibitory effect of delphinidin was similar to that of



Gleevec, a PDGFR inhibitor, suggesting that low concentrations of delphinidin may have a significant impact on *in vivo* angiogenesis.

In this respect, we observed that delphinidin potently inhibited the capillary-like structure formation and stabilization by HUVEC and PASMC in response to VEGF, FGF-2 and PDGF-BB. The inhibitory effect of delphinidin *in vitro* is likely to be relevant *in vivo* since berry extracts containing anthocyanidins such as delphinidin, remarkably suppressed new blood vessel formation in Matrigel plugs implanted in mice, possibly through their inhibitory effects on both VEGFR and PDGFR. This effect is likely to be of significant importance for tumor growth *in vivo* since oral administration of berry extracts markedly reduce the growth of NCI-H460, a highly invasive lung carcinoma cell line, with 40% reduction in tumor volume. This inhibition was completely devoid of toxicity, in agreement with studies showing a lack of adverse effects for single oral administration of as much as 5000 mg/kg of berry extracts in rats (Bagchi *et al.*, 2006).

Since delphinidin targets epidermal growth-factor receptor (EGFR) (Meiers *et al.*, 2001), VEGFR-2 (Lamy *et al.*, 2006) and also, in the present paper, PDGFR- $\beta$ , it is tempting to speculate that the antitumor effect of the anthocyan-rich extract observed in our study may be related to its inhibitory effect on these pathways. In agreement with this hypothesis, combined inhibition of the VEGF and EGFR pathways has been shown to enhance antitumor efficacy and to help overcome tumor resistance mechanisms in non-small-cell lung cancer (NSCLC) (Byers et Heymach, 2007 ; Tabernero, 2007). Furthermore, it was demonstrated that the use of Gleevec in NSCLC xenografts results in decreases in phosphorylated PDGFR- $\beta$  and VEGF expression, affecting angiogenesis, intratumoral interstitial fluid pressure and tumor oxygenation (Vlahovic *et al.*, 2006).

In summary, we demonstrated for the first time that the inhibitory effect of delphinidin on angiogenesis could not only involve its inhibitory effect on VEGF (Lamy *et al.*, 2006) but also its inhibition of the PDGFR- $\beta$ . The combined inhibition by delphinidin of these two important angiogenic receptors is likely to play a central role in the antiangiogenic and antitumor activity of this compound. These findings emphasize the chemopreventive

possibilities of dietary-derived molecules and highlight the importance of nutrition in cancer prevention.

### **Acknowledgement**

R.B. is holder of a Research Chair in Cancer Prevention from Université du Québec à Montréal (UQÀM). This work was supported by a grant from the Cancer Research Society and Charles-Bruneau Foundation to R.B. We thank Dr. Jonathan Michaud-Levesque, Normand Lapierre and Denise Carrier for their technical support.

### Legends to figures

**Figure 2.1: Effect of delphinidin on phosphorylation of VEGFR-2 and PDGFR- $\beta$ .** (A) Quiescent HUVEC or (B) PASMC were incubated in serum-free medium in the presence or absence of 25  $\mu$ M delphinidin (Dp) for 18 h. (C) PASMC were incubated with cyanidin (Cy), Dp, Pelargonidin (Pg) and petunidin (Pt) at 25  $\mu$ M for 18 h. (D) PASMC were incubated with Dp (25  $\mu$ M) for 1, 2 and 5 min or (E) with Dp at the indicated concentrations for 18 h. The medium was replaced with serum-free medium without Dp, and HUVEC or PASMC were stimulated with 100 ng/mL recombinant VEGF for 1 min or 50 ng/mL recombinant PDGF-BB for 5 min. Cells were lysed and the levels of tyrosine-phosphorylated receptors were monitored by immunoprecipitation with anti-VEGFR-2 or anti-PDGFR- $\beta$  and immunoblotting with anti-Tyr(P) monoclonal antibody (PY99). Results are representative of three independent experiments.

**Figure 2.2: Effect of delphinidin on phosphorylation of ERK-1/2 induced by PDGF-BB in PASMC.** (A) Quiescent PASMC were incubated in serum-free medium in the presence or absence of Dp at the indicated concentrations for 18 h or (B) with 25  $\mu$ M Dp for 1, 10, 15 and 20 min and stimulated with 50 ng/mL recombinant PDGF-BB for 5 min. Cells were lysed and equal amounts of protein were separated by SDS-PAGE electrophoresis. The phosphorylated forms of ERK-1/2 (*top panel*) and the effects of the treatments on the amount of ERK-1/2 (*bottom panel*) were visualized by immunoblotting using specific antibodies. Results are representative of three independent experiments.

**Figure 2.3: Effect of delphinidin on PDGF-BB-induced proliferation and migration of smooth muscle cells.** (A) PASMC were pretreated for 2 h with various concentrations of Dp or (B) with Dp or Gleevec at 5  $\mu$ M before treatment with PDGF-BB. After 3 h incubation, migration was quantified by counting the cells that crossed the membrane to the lower side of the filter with optical microscopy at  $\times 50$  magnification. The number of cells that migrated was compared to that observed with PDGF-BB-treated cells. Values are means of three independent experiments ( $P < 0.001$  *versus* PDGF-BB alone); bars,  $\pm$ SEM. (C) PASMC were incubated for 48 h in the presence of 1 % FBS in the presence of the indicated concentrations

of Dp and the extent of cell proliferation was measured using the WST-1 assay. (D) Subconfluent PASCs were treated with or without 25  $\mu$ M Dp for 18 h. Adherent and nonadherent cells were collected, and viability was assessed by trypan blue exclusion. Cell death is expressed as the percentage of cells incorporating the dye relative to the total amount of cells. Results are means  $\pm$ SEM of three independent experiments.

**Figure 2.4: Effect of delphinidin on growth factor-induced tube formation and stabilization of HUVEC/PASCs in 3D fibrin gels.** HUVEC were co-cultured with PASCs within fibrin gels in serum-free medium containing (or lacking) Dp and stimulated with growth factors as described in “Materials and Methods”. (A) Co-cultured cells were pre-treated with Dp at 12.5  $\mu$ M and then stimulated with growth factors (FGF-2/VEGF or PDGF-BB/VEGF) before the formation of tubes. After 24 h, cells were photographed ( $\times 50$ ). The pictures shown are representative of three independent experiments. (B) Co-cultured cells were treated with delphinidin (( $\blacktriangle$ ) 25, ( $\blacksquare$ ) 50 or ( $\blacktriangledown$ ) 75  $\mu$ M) or Gleevec (( $\blacklozenge$ ) 25  $\mu$ M) when the tubes were formed with the addition of FGF-2 and VEGF. After 4, 5 and 6 days of culturing, the length of the tube network was quantified using a map scale calculator. Values are means of three independent experiments. Statistically significant differences, as compared to day 4 as well as between treatments at day 6, was calculated by one-way ANOVA followed by Tukey’s test (\*\*,  $P < 0.01$ ; \*\*\*,  $P < 0.001$ ); bars,  $\pm$ SEM.

**Figure 2.5: Effect of berry extracts on synergistic angiogenesis *in vivo* induced by FGF-2 and PDGF-BB.** Crl:CD-1<sup>®</sup>-Foxn1<sup>nu</sup> nude mice were injected s.c. with 0.5 mL of Matrigel containing berry extract (500 or 1000  $\mu$ g/mL), FGF-2 (250 ng/mL), PDGF-BB (250 ng/mL), and heparin (0.0025 units/mL) to allow the formation of solid gel plugs. After 7 days, the mice were sacrificed and Matrigel plugs were excised. Four mice were used in each group. (A) Representative Matrigel plugs that contained no growth factors (*Control*), FGF-2 alone, PDGF-BB alone or growth factors plus berry extract were photographed. (B) Matrigel plugs supplemented with FGF-2 and PDGF-BB containing or not berry extract were removed from mice after FITC-dextran injection. The vasculature was visualized and photographed using a fluorescent microscope.

**Figure 2.6: Effect of berry extract feeding on NCI-H460 tumor xenograft growth in athymic nude mice.** (A) *Upper panel.* Effect of berry extracts on phosphorylation of PDGFR- $\beta$ . PASMNC were incubated 18 h in serum-free medium in the presence or absence of the indicated concentrations of the berry extracts and stimulated with 50 ng/mL recombinant PDGF-BB for 5 min. Cells were lysed and the levels of tyrosine-phosphorylated receptors were monitored by immunoprecipitation with anti-PDGFR- $\beta$  and immunoblotting with anti-Tyr(P) monoclonal antibody. Results are representative of two independent experiments. *Lower panel.* Comparative effect of the berry extract on PDGF-BB-induced migration of PASMNC (left) and on the proliferation of PASMNC ( $\lambda$ ) and NCIH-460 tumor cells ( $\mu$ ) (right). Results are means  $\pm$  SEM of three independent experiments. (B) Tumor volume ( $\text{mm}^3$ ) as a function of berry extract treatment. Each mouse was s.c. implanted with  $2.5 \times 10^6$  cells mixed with methylcellulose in the right flank. Mice were gavaged with 200 mg/kg dose of berry extract each day for the duration of the study, starting two days before cell inoculation. Statistical significance of differences between control and berry extract-fed groups was calculated by one-way ANOVA followed by Bonferroni *t* test (\*\*\*,  $P < 0.001$  *versus* control alone); bars,  $\pm$ SEM.

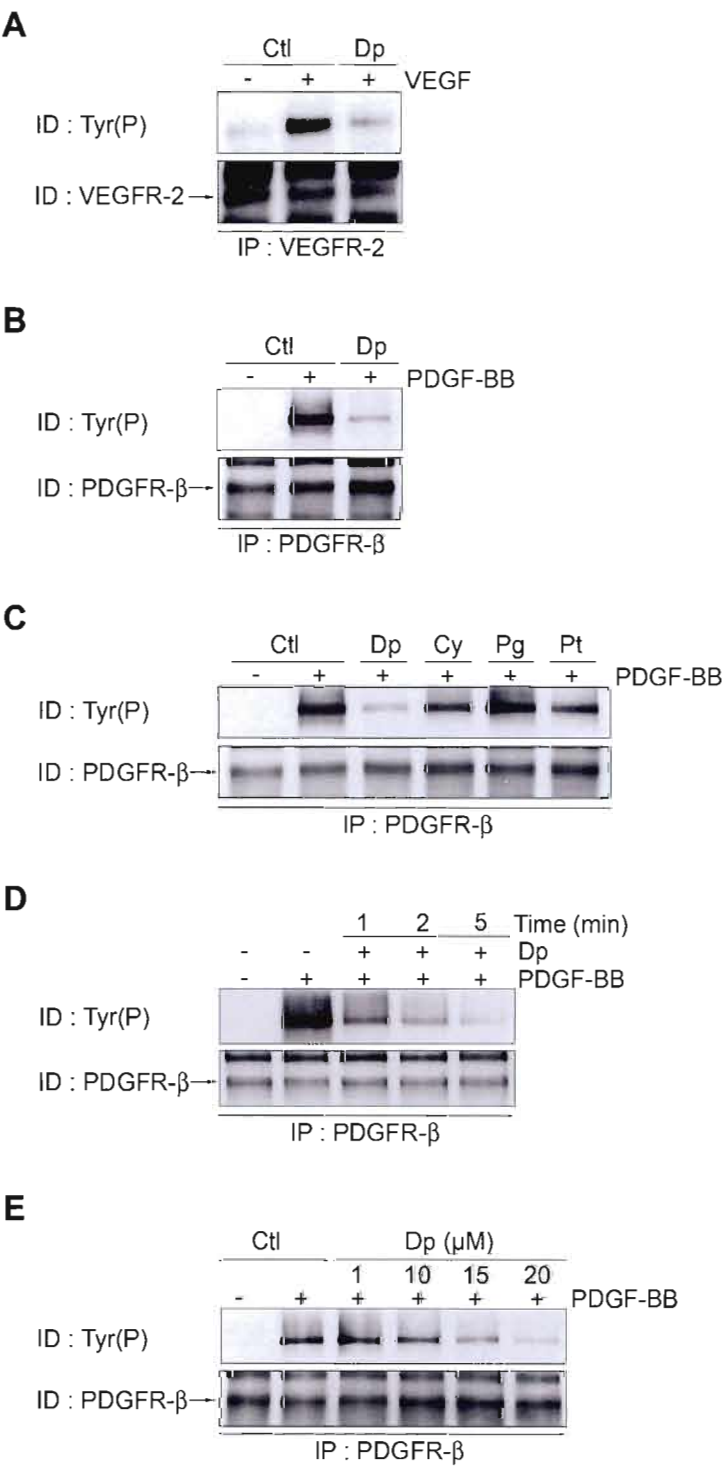


Figure 2.1

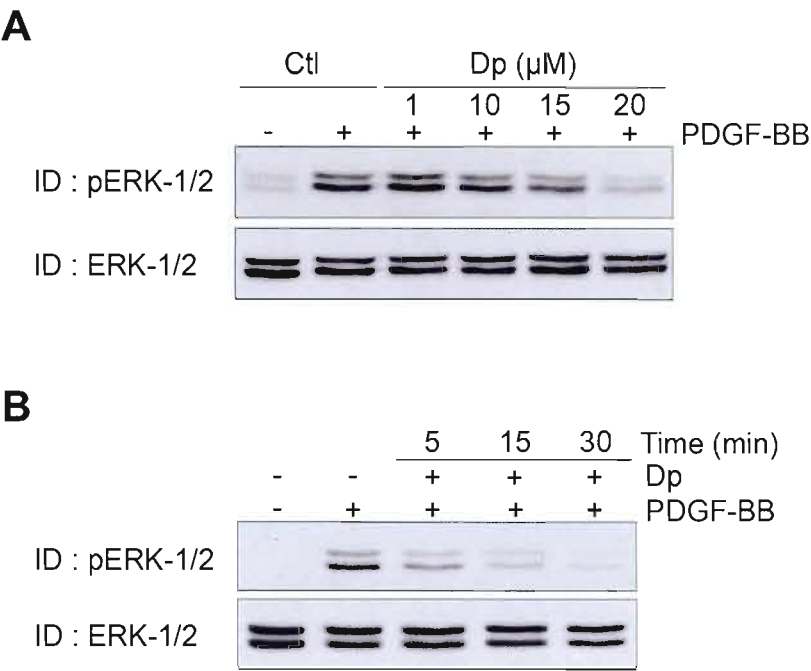


Figure 2.2



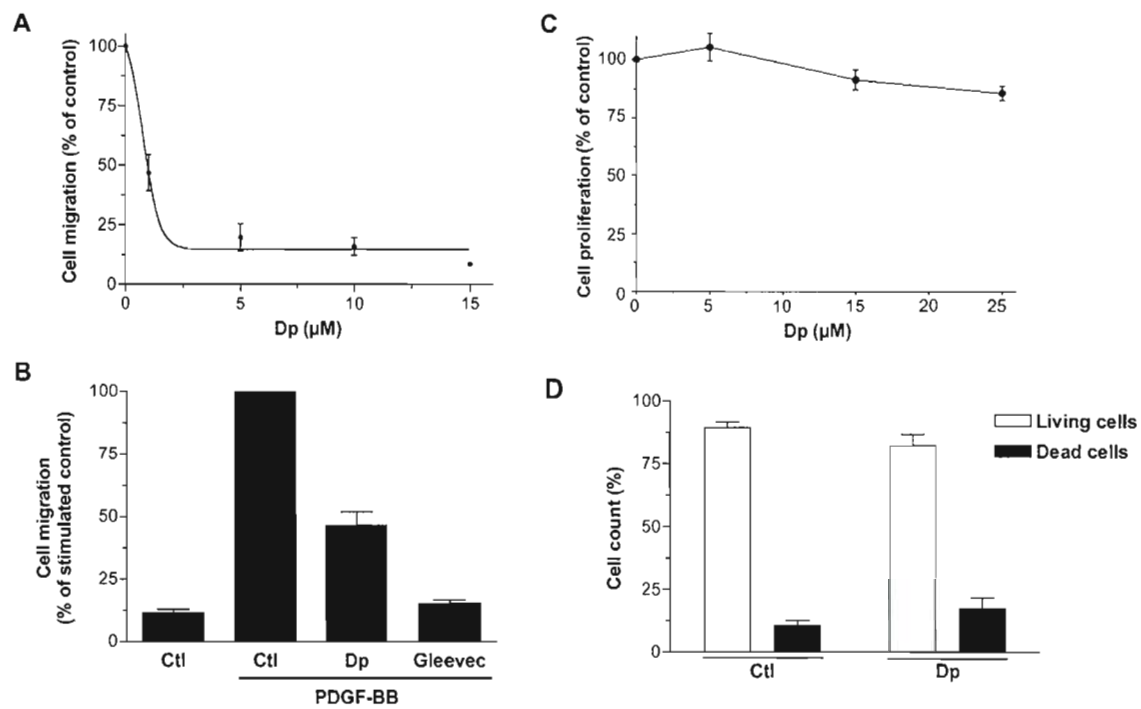


Figure 2.3

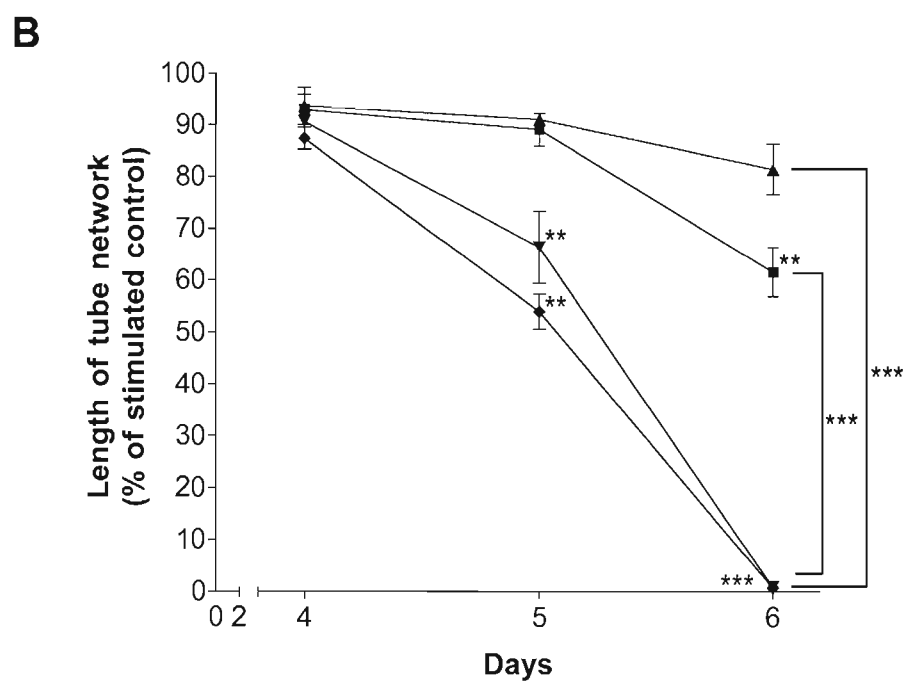
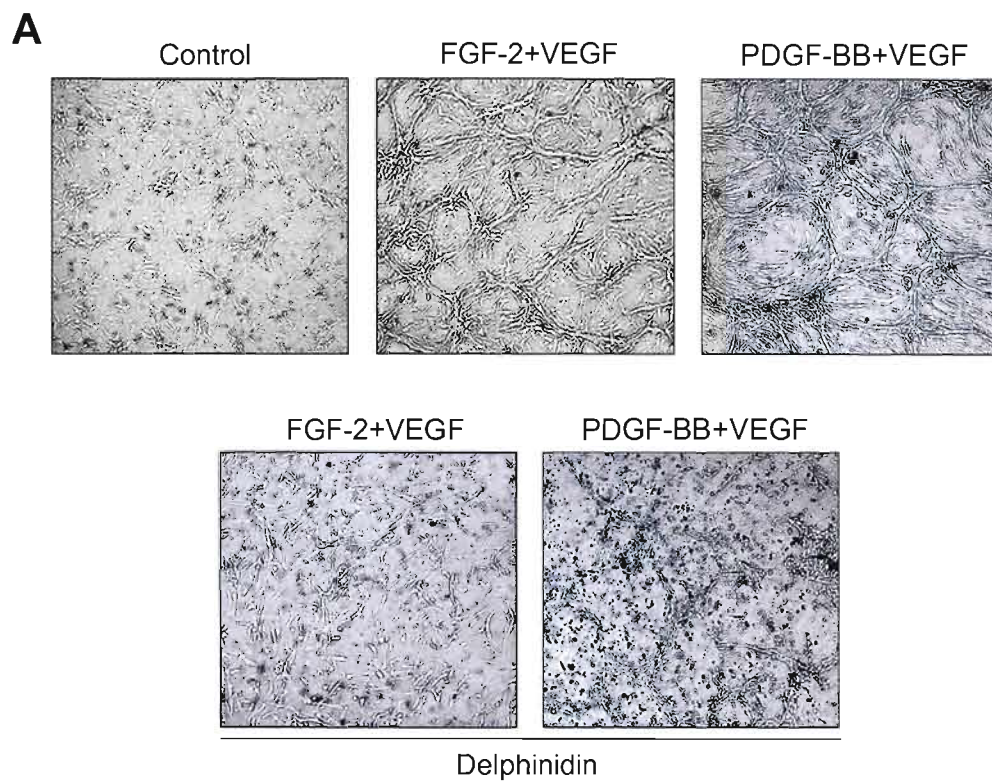


Figure 2.4

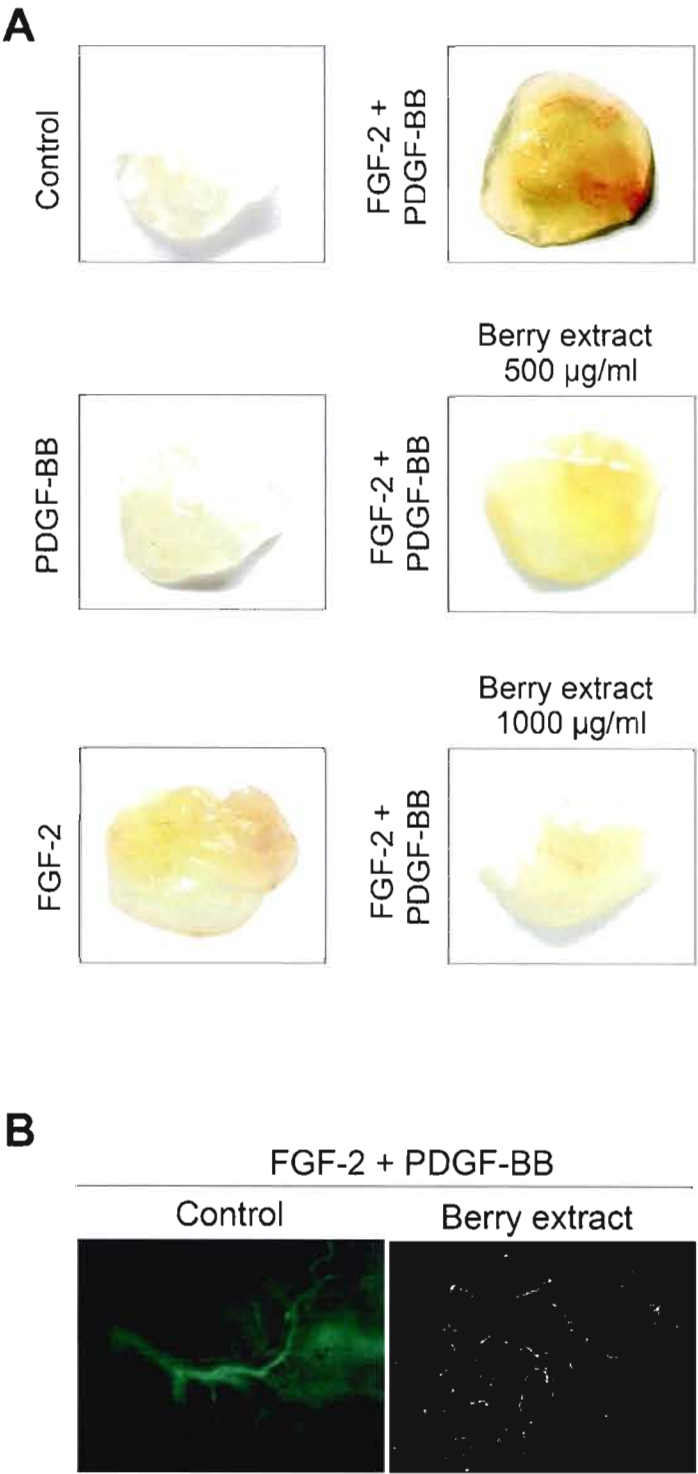


Figure 2.5

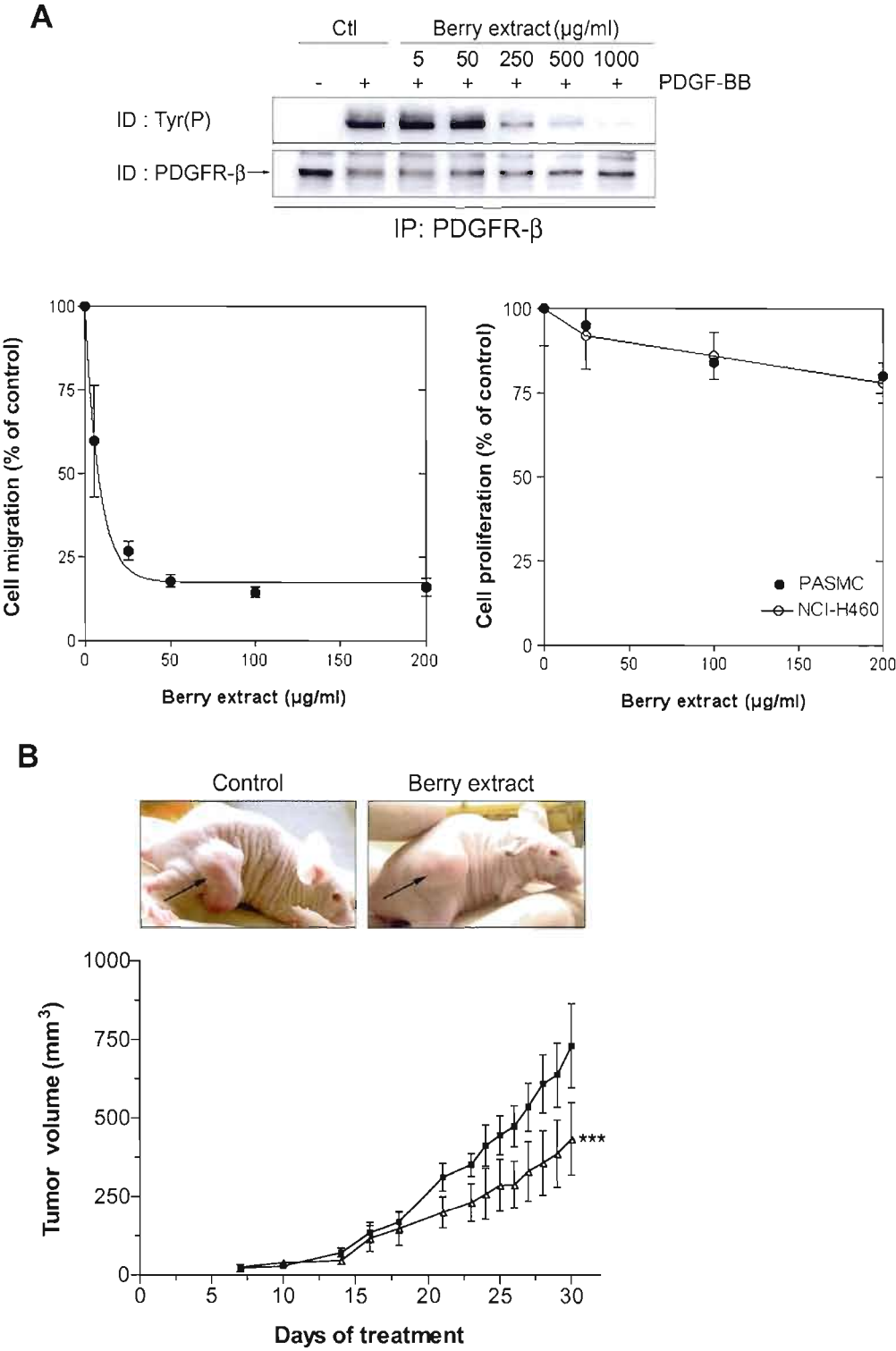


Figure 2.6

## CHAPITRE III

### THE FLAVONOLS QUERCETIN, KAEMPFEROL AND MYRICETIN INHIBIT HEPATOCYTE GROWTH FACTOR-INDUCED MEDULLOBLASTOMA CELL MIGRATION

David Labbé, Mathieu Provençal, Sylvie Lamy, Dominique Boivin, Denis Gingras, and  
Richard Béliveau\*

*Laboratoire de Médecine Moléculaire, Hôpital Ste-Justine-Université du Québec à Montréal,  
Centre de Cancérologie Charles-Bruneau, Hôpital Ste-Justine, 3175 Côte-Ste-Catherine,  
Montréal, Québec, Canada, H3T 1C5*

The authors have declared no conflict of interest.

Word count: 6289

Number of figures: 5

Number of tables: 0

Supplementary online material: 1

Running title: Flavanols inhibit medulloblastoma cell migration

#### Footnotes:

<sup>1</sup> R.B. is holder of a Research Chair in Cancer prevention from Université du Québec à Montréal (UQÀM). This work was supported by a grant from Charles-Bruneau Foundation to R.B. and from Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (NSERC) and from the Fonds de recherche sur la nature et les technologies (FQRNT) to D.L.

<sup>2</sup> Supplemental Figure 1 is available as Online Supporting Material with the online posting of this paper at <http://jn.nutrition.org>

<sup>3</sup> Abbreviations used: **ATP**, adenosine triphosphate; **BBB**, blood-brain barrier; **ECG**, (-)-epicatechin gallate; **EGCG**, (-)-epigallocatechin gallate, **EGFR**, epidermal growth factor receptor; **ERBB-1**, epidermal growth factor receptor 1; **ERBB-2**, epidermal growth factor receptor 2; **ERK**, extracellular signal-regulated kinase; **HGF**, hepatocyte growth factor; **IGFR-1**, insulin-like growth factor receptor I; **PDGFR**, platelet-derived growth factor receptor; **PI3K**, phosphatidylinositol-3-kinase; **RTK**, tyrosine kinase receptors

\* To whom correspondence should be addressed:

**Mail:** Laboratoire de Médecine Moléculaire, Centre de Cancérologie Charles-Bruneau, Hôpital Ste-Justine, 3175 Côte Ste-Catherine, Montréal, Québec, Canada H3T 1C5

**Telephone:** +1-514-345-2366

**Fax:** +1-514-345-2359

**E-mail:** [molmed@recherche-ste-justine.qc.ca](mailto:molmed@recherche-ste-justine.qc.ca)

## **Abstract**

Medulloblastoma, the most common malignant brain tumor in children, is a highly metastatic disease, with up to 30% of children having evidence of disseminated disease at presentation. Recently, the hepatocyte growth factor (HGF) and its receptor, the tyrosine kinase Met, have emerged as key components of human medulloblastoma growth and metastasis, suggesting that inhibition of this pathway may represent an attractive target for the prevention and treatment of this disease. Using immunoblotting procedures, we herein show that the dietary-derived flavonols quercetin, kaempferol and myricetin inhibit HGF/Met signaling in a medulloblastoma cell line (DAOY), preventing the formation of actin-rich membrane ruffles and resulting in the inhibition of Met-induced cell migration in Boyden chambers. Furthermore, quercetin and kaempferol also strongly diminish HGF-mediated Akt activation. Interestingly, the inhibitory effects of quercetin on the RTK Met ( $IC_{50}$  of 12  $\mu\text{mol/L}$ ) or on the Met-induced activation of Akt ( $IC_{50}$  of 2.5  $\mu\text{mol/L}$ ) occur at concentrations achievable through dietary approaches. These results highlight quercetin, kaempferol and myricetin as dietary-derived inhibitors of Met activity and suggest that this inhibitory effect may contribute to the chemopreventive properties of these molecules.

### 3.1 Introduction

Brain tumors are the second most common paediatric cancer, accounting for more than 26% of childhood cancer deaths (Legler *et al.*, 1999). Medulloblastoma is the most common of these malignant tumors (Marino, 2005 ; Polkinghorn et Tarbell, 2007) and represents up to 40% of all cerebellar tumors in childhood (Crawford, MacDonald et Packer, 2007). The treatment outcome for medulloblastoma is relatively low, resulting in a 5-year survival rate of 50% to 60% (Rossi *et al.*, 2008). Medulloblastoma is a highly metastatic disease (up to 30% of children have evidence of disseminated disease at presentation) (Crawford, MacDonald et Packer, 2007) and despite whole brain and spinal radiation for prevention and dissemination, almost half of the patients die of early tumor recurrence (Rossi *et al.*, 2008). Furthermore, most survivors suffer from significant sequelae such as devastating cognitive effects, growth impairment as a result of hormone deficiency, early puberty development and compromised spinal growth (Gilbertson, 2004).

The targeting of tumor cell signaling pathways has recently been proposed as an alternative to conventional cytotoxic approaches for the treatment of medulloblastoma (Gilbertson, 2004) (Zwick, Bange et Ullrich, 2002). Among these, tyrosine kinase receptors (RTK<sup>3</sup>) such as epidermal growth factor receptor 2 (ERBB-2), platelet-derived growth factor receptor (PDGFR) and the insulin-like growth factor receptor I (IGFR-I) are all associated with poor prognosis in medulloblastoma (Rossi *et al.*, 2008). ERBB-2 was particularly studied since its expression was correlated with a more advanced metastatic stage (Gilbertson *et al.*, 1998 ; Gilbertson *et al.*, 1997) and phase I and II trials with erlotinib (an inhibitor of ERBB-2 signaling in human medulloblastoma cells both *in vitro* and *in vivo*) is actually underway in the Children's Oncology Group and the US Pediatric Brain Tumor Consortium (Gilbertson, 2004). More recently, the hepatocyte growth factor (HGF) and its receptor Met, have emerged as a new pathway involved in the growth of human medulloblastoma (Li *et al.*, 2007 ; Li *et al.*, 2005). Met activation through HGF binding is already known to play a role in the regulation of cell growth, morphogenesis, angiogenesis and cell motility in a wide variety of human carcinomas and its expression correlates with poor prognosis (Birchmeier *et al.*, 2003 ; Trusolino et Comoglio, 2002). The importance of Met in tumor growth has led to the

development of tyrosine kinase inhibitors and monoclonal antibodies that block the activation of Met and some of these compounds are already being tested in clinical trials (Migliore et Giordano, 2008).

In addition to these promising anticancer therapeutic approaches, significant emphasis has lately been placed on chemoprevention, especially with naturally occurring products found in the diet. Abundant intake of a variety of fruit and non-starchy vegetables has been proposed as a key lifestyle factor for the prevention of a wide variety of cancer types (WCRF/AICR, 2007). Although the chemopreventive effects of fruits and vegetables remain incompletely understood, the National Cancer Institute has determined in laboratory studies that more than 1,000 different phytochemicals possess cancer-preventive activity and it is estimated that there could be as much as 100 different of these phytochemicals per serving of vegetables (Surh, 2003). Among these, flavonoids are now recognized as potent inhibitors of an array of RTK such as epidermal growth factor receptor 1 (Sah *et al.*, 2004), ERBB-2 (Pianetti *et al.*, 2002), PDGFR (Lamy *et al.*, 2008), IGFR-I (Adhami *et al.*, 2004) or the vascular endothelial growth factor receptor-2 (Lamy, Gingras et Beliveau, 2002) both *in vitro* or *in vivo*. Following ingestion, these molecules are bioavailable to a variety of tissues, including brain (Spencer, 2008), and may thus have important chemopreventive properties (Surh, 2003). The most abundant flavonoids in the diet, flavonols, exhibit numerous biological and pharmacological effects, including anticancer-related properties (Middleton, Kandaswami et Theoharides, 2000). The main flavonols are kaempferol, myricetin and quercetin (Fig. 1), the later being the most abundant bioflavonoid found in a variety of plant-based foods such as onions, apples, tea, broccoli and red wine (Scalbert et Williamson, 2000). Quercetin may also be found in the glycoside form, for example as quercitrin (Fig. 1). By contrast, the distribution of kaempferol and myricetin is more restricted with kaempferol being found primarily in caper, kale cress and broccoli while myricetin is mainly present in fennel, parsley and cranberries. Although some studies have suggested an important inhibitory potential of some flavonoids on the HGF/Met signaling pathway (Bigelow et Cardelli, 2006 ; Lee *et al.*, 2006 ; Lee *et al.*, 2008 ; Lim *et al.*, 2008), the influence of flavonols on the Met receptor remains largely unknown.



## 3.2 Materials and methods

### 3.2.1 Materials

Cell culture media were obtained from Wisent (Saint-Bruno, QC, Canada) and serum was purchased from Hyclone Laboratories (Logan, UT). Flavonols kaempferol and myricetin were obtained from Extrasynthèse (Genay, France), quercetin dihydrate and quercitrin were purchased from Sigma (St-Louis, MO) while the flavanol (-)-epigallocatechin gallate (EGCG) was obtained from MP Biomedicals (Solon, OH). Electrophoresis reagents were obtained from Bio-Rad (Mississauga, ON, Canada). The anti-Met and anti-phospho-Met (Tyr 1234/1235) monoclonal antibodies and anti-Akt, anti-phospho-Akt (Ser 473), anti-extracellular signal-regulated kinase (ERK)-1/2 and anti-phospho-p44/42 MAPK (Thr 202/Tyr204) polyclonal antibodies were from Cell Signaling Technology (Beverly, MA). Anti-mouse and anti-rabbit horseradish peroxidase (HRP)-linked secondary antibodies were purchased from Jackson ImmunoResearch Laboratories (West Grove, PA) and enhanced chemiluminescence (ECL) reagents were from PerkinElmer Life Sciences (Boston, MA). Human recombinant HGF was obtained from R & D Systems (Minneapolis, MN), the Texas Red phalloidin from Sigma (St-Louis, MO) while the Met kinase inhibitor SU11274 was purchased from EMD Chemicals (Gibbstown, NJ).

### 3.2.2 Cell culture

The human DAOY medulloblastoma cell line was purchased from ATCC (Manassas, VA) and was maintained in MEM containing 10% (v:v) BCS, 2 mmol/L glutamine, 100,000 U/L penicillin and 100 g/L streptomycin. Cells were incubated at 37°C, with 95% air and 5% CO<sub>2</sub>. For experimental purposes, DAOY were grown to confluence before overnight serum starvation without supplements. Cells were treated with vehicle or with the different compounds (flavonols and SU11274 diluted in DMSO or EGCG diluted in 100% EtOH) for 2 h and then stimulated with HGF.

### 3.2.3 Immunoblotting procedures

After treatment with HGF (50 µg/L, 3 min), DAOY were washed once with ice-cold PBS (pH 7.4) containing 1 mmol/L Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub> and were incubated in this medium free of flavonoids

and HGF for 1 h at 4°C. Cell lysates were mixed in Laemmli sample buffer as described previously (Lamy *et al.*, 2008) and resolved by sodium dodecylsulphate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) by either a 7.5% gel (Met detections) or 10% (Akt and ERK detections). The proteins were transferred onto polyvinylidene difluoride (PVDF) membranes, blocked overnight at 4°C in Tris-buffered saline/Tween 20 (147 mmol/L NaCl, 20 mmol/L Tris/HCl, pH 7.5, and 0.1% Tween 20) containing 5% (wt:v) milk powder and probed with primary antibodies (Met, pMet, Akt, pAkt, ERK, pERK) for 1 h at room temperature. Immunoreactive bands were revealed after a 1 h incubation with horseradish peroxidase-conjugated anti-mouse IgG, and the signals were visualized by enhanced chemiluminescence.

#### **3.2.4 Migration assays**

Transwells (8  $\mu$ m pore size; Costar, Cambridge, MA) were precoated with 0.15% gelatin in PBS by adding 600/100  $\mu$ L in the lower/upper chambers overnight at 4°C. The Transwells were then washed with PBS and assembled into 24-well plates. The upper chamber of each Transwell was filled with 50  $\mu$ L of cells ( $1.0 \times 10^9$  cells/L) and DAOY were allowed to adhere for 45 min. The monolayers were then treated for 2 h by adding 50  $\mu$ L of 2-fold concentrated flavonoids (kaempferol, quercetin, myricetin, quercitrin or (-)-epigallocatechin gallate) solution prepared in serum-free medium into the upper chamber and 600  $\mu$ L of the compound solution (1 x) into the lower chamber. After 2 h, HGF (20  $\mu$ g/L) was added to the lower chamber as a chemoattractant. The plate was placed at 37°C in 5% CO<sub>2</sub>/95% air for another 3 h. Cells that had migrated to the lower surface of the filters were fixed, stained and migrations were then quantified as described previously (Lamy *et al.*, 2007).

#### **3.2.5 Fluorescence and confocal microscopy**

DAOY were plated on cover glasses coated with 0.15% gelatin-PBS, serum starved overnight, treated with the vehicle, the flavonols (10  $\mu$ mol/L) or SU11274 (1  $\mu$ mol/L) for 2 h and then stimulated (or not) with 50  $\mu$ g/L HGF for 1 h. Cells were fixed with 3.7% formaldehyde for 15 min, permeabilized with 0.2% Triton X-100 for 5 min and stained for the actin cytoskeleton with a 1/2500 dilution of Texas Red phalloidin (Sigma) for 30 min.

Slides were mounted with Immuno-Fluore Mounting Medium (MP Biomedicals) and staining was visualized and photographed using a Zeiss LSM 510 Meta confocal microscope.

### **3.2.6 Cell adhesion assays**

Overnight, 96-well plates were pre-coated with 0.15% gelatin-PBS at 4°C. Wells were then blocked by adding a solution of PBS/BSA 0.5% for 1 h at room temperature and then washed with 100  $\mu$ L of adhesion buffer EMEM serum-free medium (0.2% BSA, 15 mmol/L HEPES and 0.12% NaHCO<sub>3</sub>). Meanwhile, DAOY were harvested by incubation with 0.53 mmol/L EDTA in PBS pH 7.2 for 10-15 min at 37°C. EDTA was neutralized by the addition of adhesion buffer and cells were centrifuged for 3 min at 1000 g.  $5 \times 10^4$  cells were added per well and allowed to adhere on gelatin or plastic with or without the vehicle, the flavonols or SU11274 for 2 h at 37°C. Cells were then fixed, washed, stained and lysed (Pilorget *et al.*, 2003). Spectrophotometric absorbance was then measured at 600 nm.

### **3.2.7 Statistical analysis**

The data are presented as means  $\pm$  SEM and statistical analysis was performed using one-way ANOVA with a post hoc Dunnett's test.

### 3.3 Results

#### 3.3.1 Quercetin, myricetin and kaempferol inhibit Met phosphorylation induced by HGF in DAOY

We first examined the effect of dietary flavonols on the HGF-induced tyrosine phosphorylation of Met using a monoclonal antibody that recognizes the phosphorylation of two tyrosine residues (1234/1235) that are required for complete activation of the HGF/Met signaling pathway (Ferracini *et al.*, 1991 ; Longati *et al.*, 1994). Quiescent DAOY were incubated for 16 h in serum-free medium, treated with the vehicle or the indicated concentration of flavonols (quercitrin, quercetin, myricetin and kaempferol) for 2 h and then stimulated with human recombinant HGF (50  $\mu\text{g/L}$ ) for 3 min. The green tea catechin (-)-epigallocatechin gallate (EGCG) (Fig. 1) was used as a positive control since this polyphenol successfully inhibits HGF signaling in the immortalized, nontumorigenic breast (MCF10A), in the invasive breast carcinoma (MDA-MB-231) (Bigelow et Cardelli, 2006) and in the hypopharyngeal carcinoma (FaDu) cell lines (Lim *et al.*, 2008). Quercetin, myricetin and kaempferol dramatically reduced the phosphorylation of Met induced by HGF at a concentration of 20  $\mu\text{mol/L}$ , while quercitrin had no effect (Fig. 2, top panel). Blotting of the lysates with an antibody directed against Met showed that the molecules did not affect the amount of this receptor in the treated cells (Fig. 2, bottom panel). Dose-dependent experiments indicated that among the flavonols, quercetin, myricetin and kaempferol were able to inhibit Met phosphorylation induced by HGF in DAOY in a dose-dependent manner, with an  $\text{IC}_{50}$  of 12  $\mu\text{mol/L}$  for quercetin and approx. 6  $\mu\text{mol/L}$  for myricetin and kaempferol. However, quercitrin did not inhibit HGF-induced Met phosphorylation even at 20  $\mu\text{mol/L}$  (Fig. 2, top panels).

#### 3.3.2 Low concentrations of quercetin and kaempferol inhibit Akt phosphorylation induced by HGF in DAOY

Medulloblastoma is a highly metastatic cancer that is found to be disseminated in up to 43% of patients (Crawford, MacDonald et Packer, 2007). Within the family of tyrosine kinase receptors, ERBB-2 (HER2/NEU), a member of the epidermal growth factor receptor family (EGFR) and the platelet-derived growth factor receptor (PDGFR- $\beta$ ) are known to increase the

metastatic potential of medulloblastoma through, among others, the activation of Akt and ERK-1/2 (Crawford, MacDonald et Packer, 2007 ; Gilbertson, 2004). Besides its role in cell survival and cell proliferation, Met signaling is also a potent activator of the cell invasive growth capacities (Birchmeier *et al.*, 2003). Met activation through HGF association results in Akt and ERK-1/2 phosphorylation, thereby promoting cell migration (Migliore et Giordano, 2008). In order to investigate whether the inhibition of Met tyrosine phosphorylation by flavonols also results in the inhibition of downstream intracellular signaling events, we examined the effect of these molecules on the HGF-induced Akt and ERK-1/2 phosphorylation. DAOY were serum-starved for 16 h before a 2 h treatment with the vehicle, the flavonols or EGCG as a positive control. The treatment was followed by a 3 min stimulation with human recombinant HGF (50  $\mu\text{g/L}$ ). Quercetin and kaempferol, at very low concentrations, successfully inhibited Akt phosphorylation induced by the activation of Met signalling (Fig. 3). In fact, the inhibition of Akt phosphorylation occurs with an  $\text{IC}_{50}$  of 2.5  $\mu\text{mol/L}$  for quercetin and 5  $\mu\text{mol/L}$  for kaempferol, while quercitrin and myricetin did not inhibit this process. The inhibition of Akt phosphorylation by quercetin was lower than that observed with EGCG ( $\text{IC}_{50}$  of 5  $\mu\text{mol/L}$ ). In addition, although EGCG successfully inhibited ERK-1/2 phosphorylation, as previously reported for HGF-induced Met activation in two breast cell lines (Bigelow et Cardelli, 2006), the flavonols did not modulate ERK-1/2 phosphorylation induced by Met activation (please see Supplemental Figure 1).

### **3.3.3 Myricetin, kaempferol and quercetin inhibit HGF mediated DAOY cell migration**

The serine/threonine kinase Akt is an important mediator of cell migration and invasion in various cell types (Manning et Cantley, 2007), including medulloblastoma (Gilbertson, 2004). Since quercetin and kaempferol inhibited HGF-induced Met and Akt phosphorylation, we studied the effect of these molecules on DAOY migration. Cells were allowed to adhere to gelatin-coated Transwells and were incubated for 2 h with different concentrations of flavonols before the addition of HGF (20  $\mu\text{g/L}$ ) to the lower chambers. Under these conditions, myricetin, kaempferol and quercetin inhibited HGF-induced migration of DAOY in a dose-dependent manner, while quercitrin had no effect (Fig. 4). We next compared the efficacy of myricetin, kaempferol and quercetin in inhibiting DAOY migration to SU11274, a Met-specific small molecule inhibitor that competes with the binding of adenosine

triphosphate (ATP) to the kinase domain of the receptor (Wang *et al.*, 2003). SU11274 was found to be 10-fold more effective in the inhibition of HGF-mediated migration with an approximate  $IC_{50}$  of 0.5  $\mu\text{mol/L}$  compared to an  $IC_{50}$  of around 5  $\mu\text{mol/L}$  for myricetin and kaempferol and 20-fold more effective than quercetin ( $IC_{50}$  of 10  $\mu\text{mol/L}$ ) (Fig. 4). These results indicate that myricetin, kaempferol and quercetin, naturally occurring molecules, are within one order of magnitude as efficient as SU11274 at inhibiting HGF-induced DAOY migration.

#### ***3.3.4 Treatment with the flavonols kaempferol, quercetin and myricetin or with the Met kinase inhibitor SU11274 prevents morphological changes induced by HGF in DAOY***

Upon HGF stimulation, Met activation induces several biological responses such as the activation of the cell invasive program (Gentile, Trusolino et Comoglio, 2008) which results in cell morphological changes such as actin reorganization (Soldati *et al.*, 2008). We sought to investigate whether treatments of the cells with flavonols modify DAOY morphology using confocal microscopy. DAOY grown on gelatin-coated coverslips showed a relatively uniform actin repartition as visualized by phalloidin staining (Fig. 5). Stimulation of DAOY with 50  $\mu\text{g/L}$  HGF for 1 h caused the formation of actin-rich membrane ruffles at the cell periphery (indicated by arrows), a key event in cell migration, and the formation of these ruffles was inhibited by a 2 h treatment with SU11274 prior to HGF stimulation. Interestingly, preincubation of the cells with kaempferol, quercetin or myricetin also inhibited actin relocation induced by HGF, while quercitrin had no effect. Overall, these data indicate that the inhibition of HGF signaling pathway by the flavonols kaempferol, quercetin and myricetin prevent the reorganization of the actin cytoskeleton and therefore interferes with the morphological changes induced by HGF, leading to the inhibition of medulloblastoma cell migration.

### 3.4 Discussion

In this study, we show that low concentrations of quercetin, myricetin and kaempferol, but not quercitrin (quercetin-3-O- $\alpha$ -rhamnoside), inhibit HGF-dependent phosphorylation of Met in DAOY. To the best of our knowledge, this is the first study to highlight the inhibitory effect of flavonols on this important RTK. Since the HGF-induced Met activation was reported to be inhibited in hepatoma cells with the flavone luteolin (Lee *et al.*, 2006) and in breast epithelial cells with the green tea catechins EGCG and (-)-epicatechin gallate (ECG) (Bigelow et Cardelli, 2006), these results strongly suggest that this RTK may represent a key target of dietary-derived chemopreventive polyphenols. The inhibitory effect of quercetin and kaempferol was associated with an impairment of Akt phosphorylation, a key downstream signaling event involved in the cellular effects of Met. However, myricetin did not inhibit Akt phosphorylation even though it inhibited HGF-induced Met activation, thereby suggesting that the inhibition of other intracellular kinases involved in Akt activation are likely to be involved in the effect of quercetin and kaempferol on this pathway.

In this respect, quercetin is known to act as a potent inhibitor of the phosphatidylinositol-3-kinase (PI3K), which is essential for Akt activation, and its structure was used as a model in the development of the PI3K selective inhibitor LY294002 (Vlahos *et al.*, 1994). Its effect on Akt activation may thus be the sum of an effect on the upstream signal (Met and PI3K inhibition) and on the Akt phosphorylation (Spencer, Rice-Evans et Williams, 2003). The loss of a hydroxyl group at position 3' in the B ring of quercetin (giving kaempferol) did not alter the potential in inhibiting both Met and Akt activation while the addition of a hydroxyl group at position 5' in the B ring (giving myricetin) kept the Met specific inhibition while losing the Akt inhibition (Fig. 1). Furthermore, quercetin glycosylation (giving quercitrin) inhibits its activity against Met and Akt activation suggesting that the sugar moiety interferes with quercetin potential. Although the exact mechanisms underlying the inhibitory effect of these flavonols on the HGF-induced Met and Akt activation in DAOY remains to be determined, previous work has demonstrated that quercetin binds directly to PI3K in the ATP binding pocket (Walker *et al.*, 2000) and the green tea catechin EGCG inhibits tyrosine kinase receptor activation by competing for the

ATP binding pocket (Li *et al.*, 2007). It is thus tempting to speculate that a similar mechanism is responsible for flavonol and EGCG activity against Met activation. Interestingly, no effect on the phosphorylation of the p42<sup>MAPK</sup> and p44<sup>MAPK</sup> forms (ERK-1/2) was observed in DAOY cells. These results stand in contrast to those obtained by other groups who showed a decrease of ERK phosphorylation in JB6 mouse epidermal cells (Lee *et al.*, 2008) or an increase in ERK activity in A549 lung cancer cells (Nguyen *et al.*, 2004) with quercetin. These discrepancies are likely due to differences in experimental conditions, notably the use of different cell types.

Importantly, the inhibition of Met by quercetin, myricetin and kaempferol was correlated with an inhibition of DAOY migration, a crucial event implicated in medulloblastoma metastasis. Interestingly, the Met kinase inhibitor SU11274 was only between ten to twenty times more efficient than flavonols in inhibiting migration, suggesting that low flavonol concentrations may have an impact on cell migration *in vivo*. Furthermore, all flavonols (except quercitrin) as well as SU11274 prevent morphological changes induced by HGF in the DAOY cell migration process, suggesting that the inhibition of Met impairs cytoskeleton reorganization events underlying migration. However, flavonols do not antagonize the cell migration process through the upregulation of cell adhesion (data not shown) as previously demonstrated with EGCG in DAOY (Pilorget *et al.*, 2003).

The flavonol content of the diet is estimated to be between 20-35 mg/d (Manach *et al.*, 2005) of which quercetin represents the predominant flavonol (16 mg/d, expressed as aglycone) (Hertog *et al.*, 1993). Quercetin naturally occurs as a glucoside or as various glycoside forms which are either hydrolysed by intestinal enzymes or by the colonic microflora before they can be absorbed (Manach *et al.*, 2004). Quercetin is of particular interest since micromolar plasma concentration is achievable through diet. Graefe *et al.* showed that an onion supplement consisting of 160 g stewed and homogenized onions, which provided 331  $\mu\text{mol/L}$  of quercetin glucosides (equivalent to 100 mg quercetin), was sufficient to observe a quercetin plasma peak concentration of 7.6  $\mu\text{mol/L}$  (Graefe *et al.*, 2001). Furthermore, one characteristic feature of quercetin bioavailability is that the elimination of quercetin metabolites is quite slow, with reported half-lives ranging from 11 to 28 h. This is



particularly interesting since this could favor accumulation in plasma with repeated intakes (Manach *et al.*, 2005). These observations thus suggest that the inhibitory effect of quercetin on the RTK Met or on the Met induced Akt activation occurs at concentrations achievable through dietary approaches (IC<sub>50</sub> of 10  $\mu$ mol/L for Met and 2.5  $\mu$ mol/L for Akt).

Importantly, in *in vitro* and *in situ* models of the blood-brain barrier (BBB), it was demonstrated that quercetin was able to enter different regions of the brain as a substrate of P-glycoprotein, a BBB efflux transporter (Youdim *et al.*, 2004). This is in agreement with animal feeding studies that provide evidence that other flavonoids, such as the tea flavanol epigallocatechin gallate, may access the brain following oral administration to mice (Suganuma *et al.*, 1998). Feeding of blackberry (Talavera *et al.*, 2005) or blueberry (Andres-Lacueva *et al.*, 2005) extracts rich in anthocyanidins in rats also showed intracerebral localization of the molecules. Together, these results suggest that quercetin, among other dietary flavonoids, may access the brain after oral ingestion in humans. Although the potential chemopreventive effects of polyphenols on pediatric brain tumor development remains poorly understood, it is noteworthy that a good maternal diet during pregnancy, including high consumption of fruits and vegetables, showed a strong protective dose-response relation on the risk of paediatric brain tumors (Bunin *et al.*, 1993), whereas a high consumption of unhealthy foods, such as French fries, showed a significant increased odds ratio (Bunin *et al.*, 2005). Our results also suggest that, given the high rate of cancer recurrence within 5 years for medulloblastoma survivors (around 40%), a diet rich in flavonol-containing foods may play a crucial role in the secondary prevention of these tumors.

The use of drug combinations to circumvent tumour resistance is a well-established principle of cancer therapy (Dancey et Chen, 2006). Recent advances indicate that Met and EGFR in glioma cells act as independent and redundant inputs to intracellular signaling networks, suggesting that single-target inhibition of either Met or EGFR would be ineffective (Stommel *et al.*, 2007). As EGFR and now Met are known to be implicated in medulloblastoma aggressiveness, phytochemicals that target both RTK such as quercetin (Fridrich *et al.*, 2008 ; Kern *et al.*, 2005), may thus circumvent this limitation and inhibit

tumor cell progression more effectively. Furthermore, quercetin-rich foods also contain plenty of other phytochemicals which may act synergistically with quercetin and increase its chemopreventive activity. For example, broccoli, a rich source of quercetin, also contains high levels of sulforaphane, an isothiocyanate that inhibit angiogenesis through the inhibition of metalloproteinase-9-activated human brain microvascular endothelial cell (HBMEC) migration and tubulogenesis (Annabi *et al.*, 2008) and induce medulloblastoma cell apoptosis (Gingras *et al.*, 2004).

In summary, these results suggest that flavonols, at concentrations achievable through diet, inhibit DAOY cell migration by an effect on both Met and Akt (but not on ERK-1/2) as well as on the cell actin cytoskeleton and that these effects may prevent invasion and metastasis by these cells (Machesky, 2008). Further studies aimed at the identification of the beneficial effects of flavonols on medulloblastoma growth *in vivo* should provide interesting information on the clinical usefulness of these dietary-derived molecules in the prevention of paediatric brain tumors.

### **Acknowledgements**

The authors would like to thank Mr. Ryan Veitch for his careful reading of the manuscript.

### Legends to figures

**Figure 3.1: Structure of flavonols and of the green tea flavanol (-)-epigallocatechin gallate (EGCG).**

**Figure 3.2: Quercetin, myricetin and kaempferol inhibit Met phosphorylation induced by HGF in DAOY.** Quiescent DAOY were incubated in serum-free medium for 16 h and then treated with the vehicle, quercitrin, quercetin, myricetin, kaempferol or EGCG with the indicated concentrations of the molecules for 2 h. Cells were stimulated with recombinant HGF (50  $\mu\text{g/L}$ ) for 3 min. Equal amounts of protein from cell lysates were subjected to SDS-polyacrylamide gel electrophoresis. Levels of the phosphorylated form of Met and total Met were visualized by immunoblotting using specific monoclonal antibodies and quantified by densitometry. GAPDH protein levels served as an internal standard. Values indicate the ratio of phosphorylated Met to total Met protein.

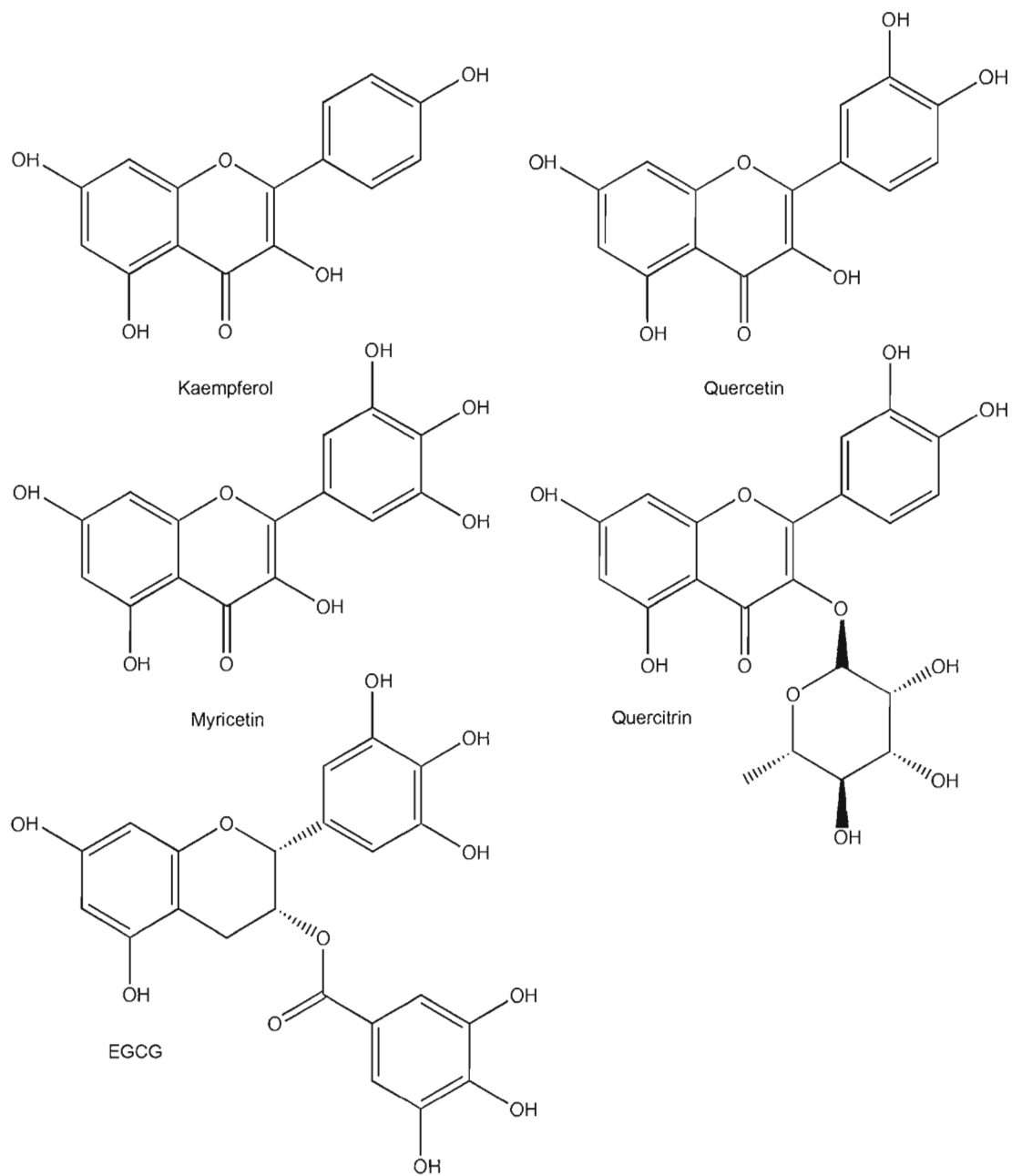
**Figure 3.3: Quercetin and kaempferol inhibit Akt phosphorylation induced by HGF in DAOY.** DAOY were serum-starved for 16 h and then treated with the vehicle, quercitrin, quercetin, myricetin, kaempferol or EGCG at the indicated concentrations for 2 h. Cells were stimulated with recombinant HGF (50  $\mu\text{g/L}$ ) for 3 min. Cells were lysed and equal amounts of protein were analysed by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis followed by electrotransfer onto PVDF membranes. Immunoblot detection was performed with polyclonal antibodies directed against the phosphorylated form of Akt. Total Akt and GAPDH protein levels in cell lysates were detected as controls. Values indicate the ratio of phosphorylated Met to total Met protein.

**Figure 3.4: Flavonols myricetin, kaempferol and quercetin inhibit HGF-mediated DAOY cell migration.** DAOY cells were pretreated with the different flavonols (myricetin, kaempferol, quercetin and quercitrin) with various concentrations for 2 h. Migration was initiated by adding 20  $\mu\text{g/L}$  of recombinant HGF for 3 h. The same protocol was used for the

specific Met kinase inhibitor SU11274. Migration was quantified by counting the cells that crossed the membrane to the lower side of the filter with optical microscopy at magnification x50. The number of cells that migrated was compared to that observed with untreated cells. Values are means of at least three independent experiments (\*,  $P < 0.05$ ; \*\*,  $P < 0.01$  vs. control alone).

**Figure 3.5: Kaempferol, quercetin and myricetin prevent morphological changes induced by HGF in DAOY.** DAOY ( $2 \times 10^4$  cells/well) were seeded onto gelatin-coated coverslips in a 24-well plate. Cells were serum-starved overnight, treated for 2 h with the vehicle or the different compounds and then stimulated with  $50 \mu\text{g/L}$  HGF for 1 h at  $37^\circ\text{C}$ . Cells were fixed and stained with Texas Red-conjugated phalloidin for actin. Representative cell images were obtained by confocal microscopy, as described in *Material and methods*.

**Supplemental Figure 3.1: Flavonols does not affect ERK phosphorylation induced by HGF in DAOY.** DAOY were serum-starved for 16 h and then treated for 2 h with the vehicle, quercitrin, quercetin, myricetin, kaempferol or EGCG at the indicated concentrations. Cells were then stimulated with recombinant HGF ( $50 \mu\text{g/L}$ ) for 3 min. Cells were lysed and equal amounts of protein were analysed by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis followed by electrotransfer onto PVDF membranes. Immunoblot detection was performed with polyclonal antibodies directed against the phosphorylated form of ERK. Total ERK found in cell lysates were detected as control and GAPDH was used as an internal standard.

**Figure 3.1**

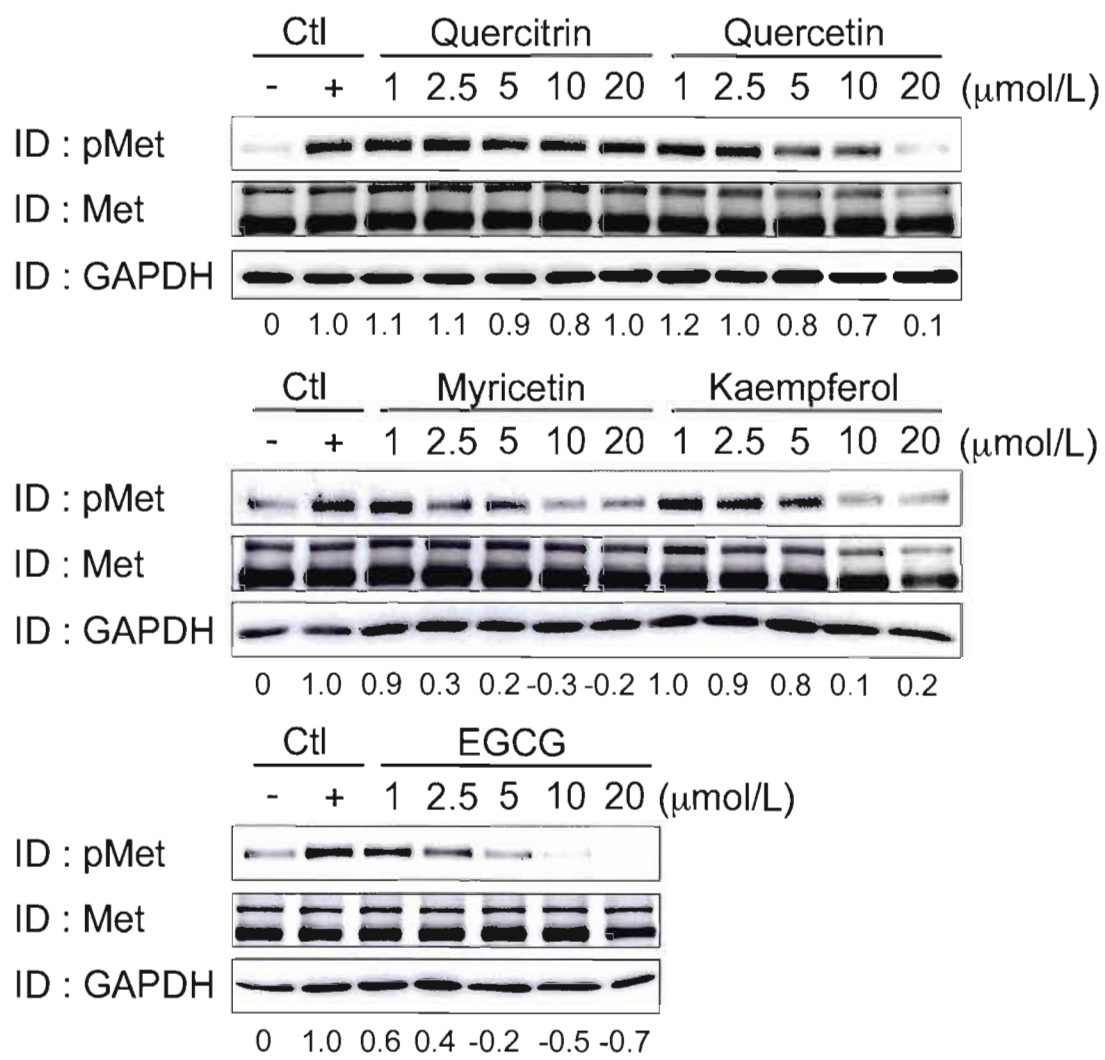


Figure 3.2

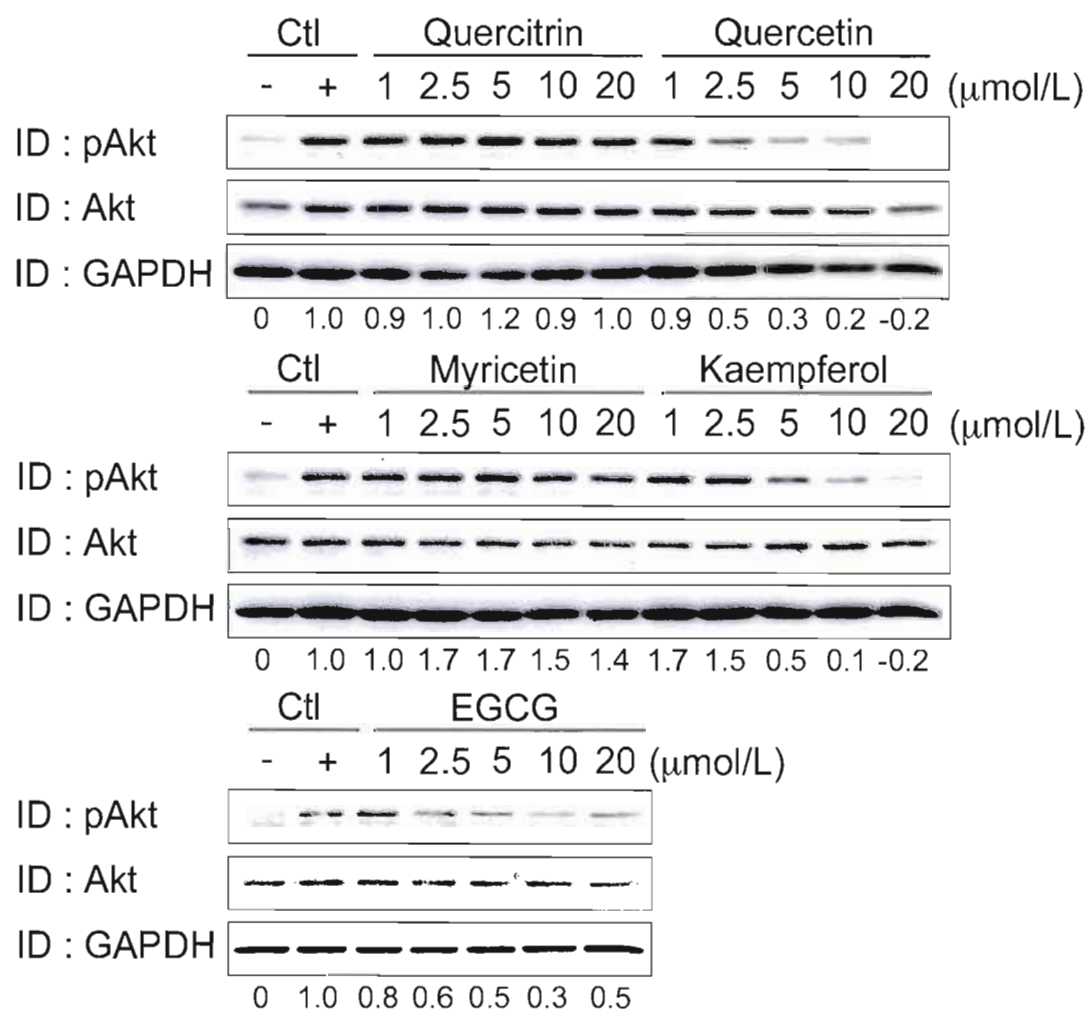


Figure 3.3



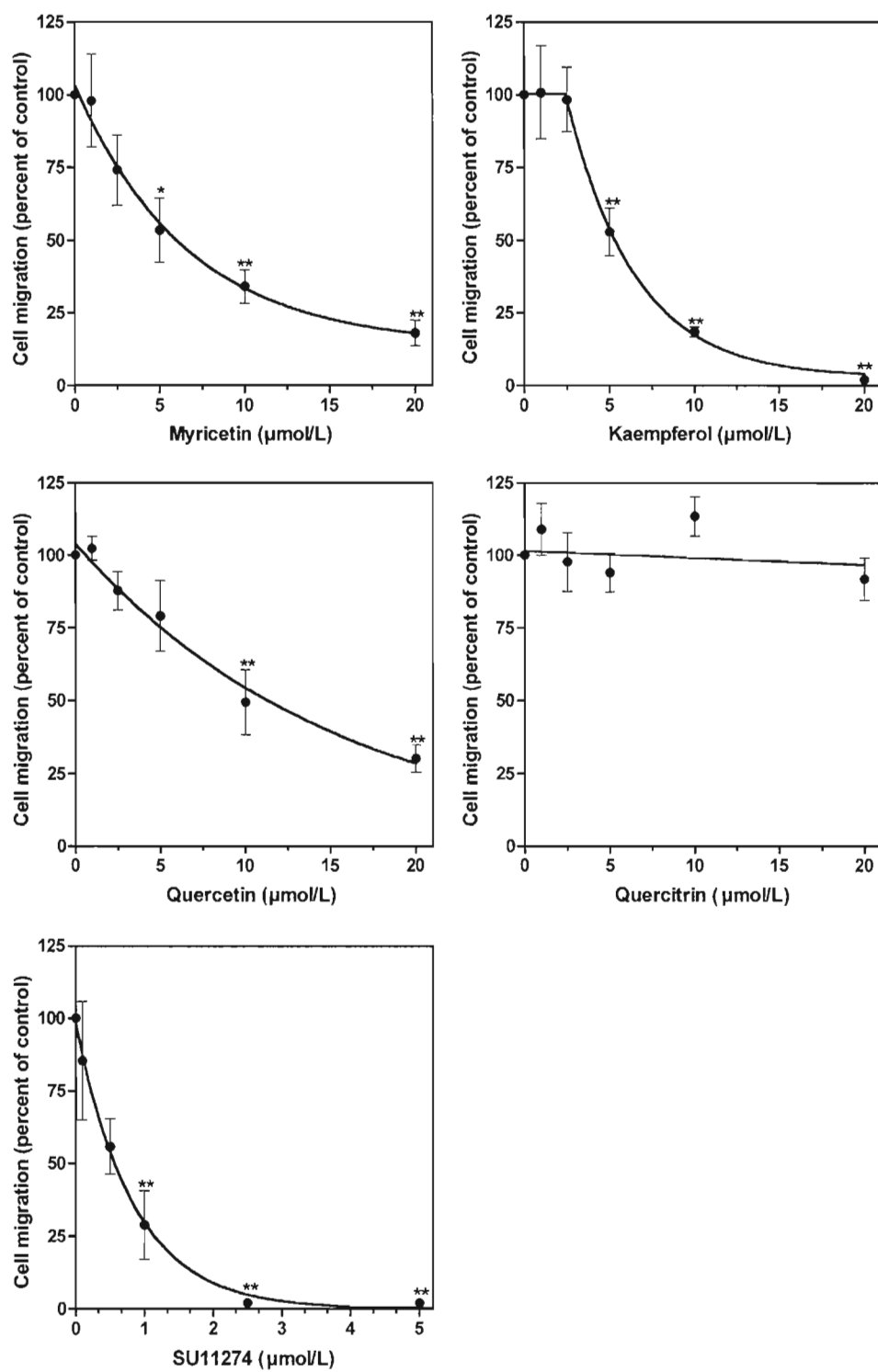


Figure 3.4

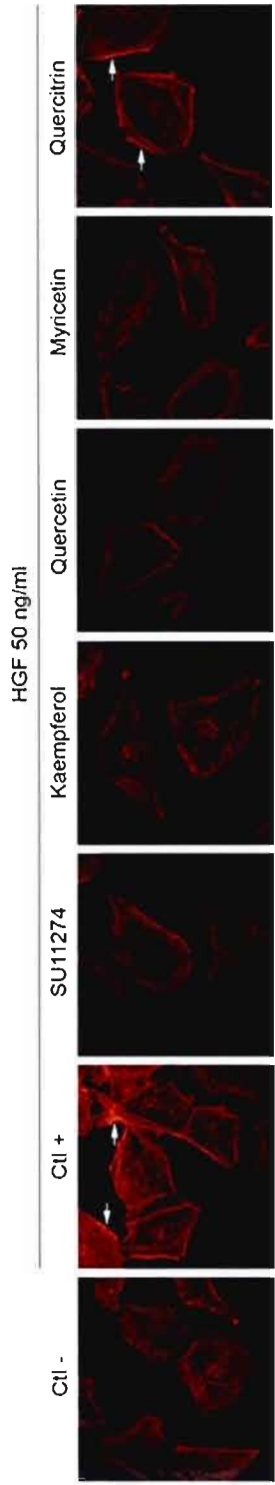
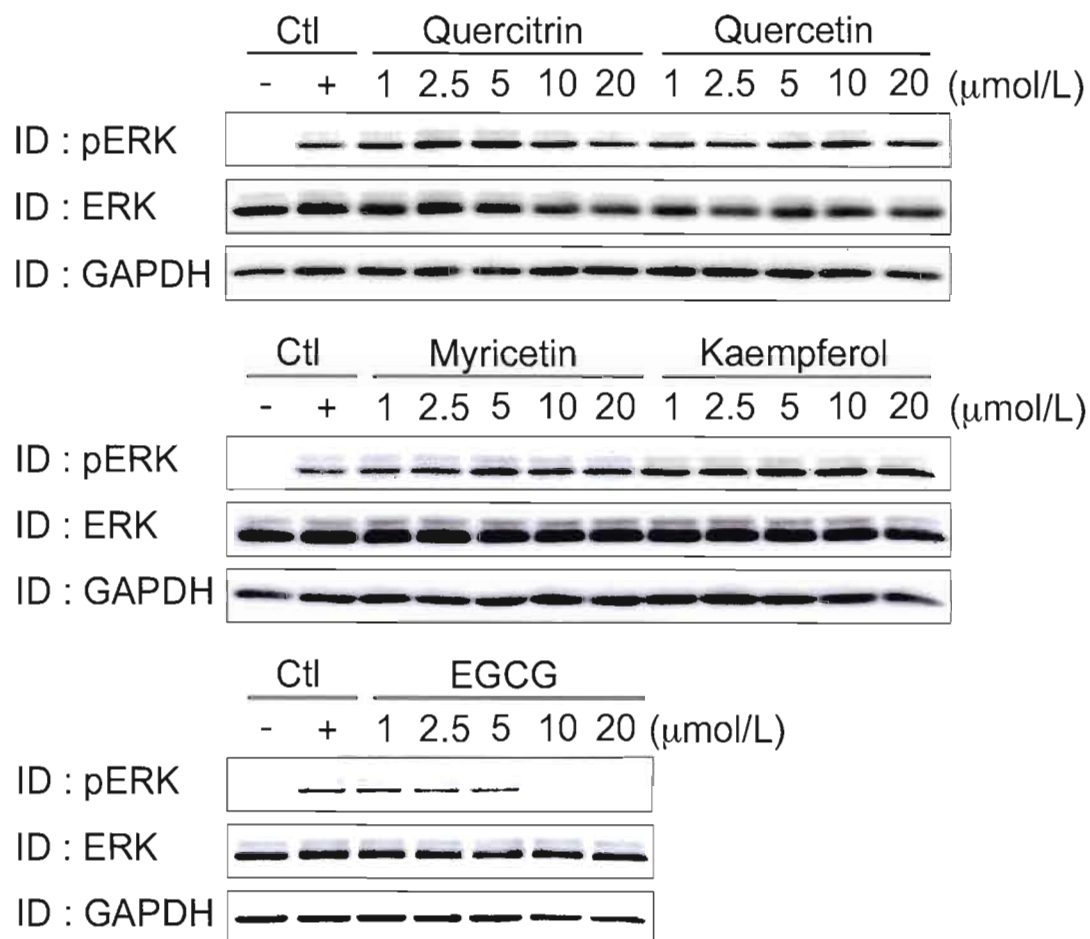


Figure 3.5



Supplemental Figure 3.1

## CHAPITRE IV

### DISCUSSION

Les thérapies moléculaires antiangiogéniques et antimétastatiques représentent un nouvel espoir dans le traitement du cancer, promettant une longévité accrue, tout en causant des effets secondaires moins prononcés en comparaison aux traitements conventionnels. Dans ce contexte, plusieurs polyphénols d'origine alimentaire possèdent un excellent potentiel d'inhibition des processus d'angiogenèse et de formation de métastases, puisqu'ils ont pour cible une large gamme de récepteurs à activité tyrosine kinase. Bien que les mécanismes d'action de ces molécules bioactives soient généralement peu connus, celles-ci jouent sans aucun doute un rôle important dans le processus de prévention du cancer par l'alimentation.

#### **4.1 Efficacité relative des flavonoïdes en comparaison avec des inhibiteurs spécifiques**

Les résultats obtenus lors de la présente étude démontrent que les anthocyanes, la delphinidine, la cyanidine et la pétunidine, mais pas la pélargonidine, sont en mesure d'inhiber la phosphorylation de PDGFR- $\beta$  induite par PDGF-BB. Ces résultats suggèrent l'importance du groupement hydroxyle (delphinidine, cyanidine) ou O-méthyle (pétunidine) en position  $R_1$  dans le potentiel inhibiteur de ces molécules. De plus, la présence d'un autre groupement hydroxyle en position  $R_2$  augmente substantiellement le potentiel de la delphinidine par rapport aux autres anthocyanidines (Figure 1.7). En effet, celle-ci a été capable d'inhiber l'activation de ERK-1/2 ainsi que la migration des cellules musculaires lisses (PASMC) induite par le PDGF-BB, sans interférer sur les mécanismes de prolifération et de mort cellulaire. Particulièrement efficace, l'inhibition de la migration des cellules musculaires lisses est seulement un ordre de grandeur inférieure à celle induite par le

Gleevec, un puissant inhibiteur de PDGFR- $\beta$ , soulignant la sensibilité de ce récepteur aux polyphénols d'origine alimentaire.

La delphinidine a également démontré un excellent potentiel dans un modèle expérimental de coculture contenant des cellules endothéliales (HUVEC) et des PSMC. Stimulée à la fois avec du VEGFA, favorisant la production de PDGF-BB chez les HUVEC et avec du FGF-2, favorisant l'expression de PDGFR- $\beta$  chez les PSMC, la delphinidine a été en mesure d'inhiber la formation de tube dans ce modèle *in vitro* plus complexe. De plus, cette inhibition par la delphinidine a été observée à une concentration seulement trois fois supérieure à celle du Gleevec. Afin de valider ces informations dans un contexte de prévention, nous avons testé l'efficacité d'un extrait de baies riches en anthocyanes, dont en delphinidine, dans un modèle d'angiogenèse tumorale *in vivo*. Un implant de matrigel contenant à la fois l'extrait de baies, simulant la présence de polyphénols dans l'organisme suite aux repas et du FGF-2/PDGF-BB, reconnus pour former un réseau vasculaire stable *in vivo*, a été injecté de façon sous-cutanée chez la souris nue. Ainsi, une concentration de 500  $\mu\text{g/ml}$  d'extrait de baies a fortement réduit l'angiogenèse par rapport au contrôle, tandis qu'une concentration de 1000  $\mu\text{g/ml}$  l'a pratiquement complètement inhibée. Cependant, il est probable que le fort potentiel de la delphinidine sur l'angiogenèse ne soit pas seulement lié à son effet sur PDGFR- $\beta$ , mais également à celui sur VEGFR-2, tel que publié par notre laboratoire (Lamy *et al.*, 2006).

Dans un contexte de traitement du cancer, nous avons injecté de façon sous-cutanée des souris nues avec des cellules du cancer du poumon chez l'humain (NCI-H460), cellules reconnues pour surexprimer PDGF-BB et PDGFR- $\beta$ . Les souris, gavées tous les jours avec l'extrait riche en anthocyanes dans une proportion de 200 mg/kg par masse corporelle, ont démontré un volume tumoral moyen inférieur de 40,6 % à celui des souris contrôles ( $P < 0,001$ ). Il est à noter que l'extrait de baies a démontré, à l'image de la delphinidine, un effet inhibiteur sur la phosphorylation de PDGFR- $\beta$  et sur la migration des PSMC induite par PDGF-BB, sans toutefois avoir d'effets sur la prolifération des cellules PSMC et des cellules tumorales. Encore une fois, puisque la delphinidine inhibe également le récepteur à tyrosine kinase VEGFR-2 mais aussi ERBB-1 (Meiers *et al.*, 2001), il est probable que l'effet

antitumoral de l'extrait de baies soit lié à un effet combiné sur ces trois récepteurs. Dans un modèle de xénogreffe similaire, le Gleevec a été en mesure de diminuer le niveau de PDGFR- $\beta$  phosphorylé et l'expression de VEGF, affectant l'angiogenèse tumorale, la pression interstitielle intratumorale et l'oxygénation de la tumeur (Vlahovic *et al.*, 2006).

Dans l'autre volet de nos recherches, les flavonols, soit la quercétine, la myricétine et le kaempferol, mais non le quercitrin (quercétine-3-O- $\alpha$ -rhamnoside), ont quant à eux été en mesure d'inhiber la phosphorylation du récepteur à tyrosine kinase Met induite par le HGF. Ceci correspond à la première démonstration que certains flavonols, à l'image de la flavone lutéoline et des catéchines du thé vert EGCG et ECG, sont également en mesure d'inhiber Met, attestant que ce récepteur est une cible de choix pour plusieurs polyphénols d'origine alimentaire. La quercétine et le kaempferol ont également inhibé l'activation de Akt induite par Met, ce que la myricétine n'a pas été en mesure de faire, suggérant l'importance d'un lien structure/fonction. L'inhibition de Akt par la quercétine était prévisible, puisqu'il est un inhibiteur très fort de la PI3K, une kinase localisée en amont de la cascade menant à l'activation de Akt par Met. En effet, la structure de la quercétine a même servi de modèle dans l'élaboration du LY294002, un inhibiteur spécifique de la PI3K (Vlahos *et al.*, 1994).

L'inhibition de Met par la quercétine, la myricétine et le kaempferol contribue également à l'inhibition de la migration des cellules de médulloblastome (DAOY), un évènement crucial responsable de la formation de métastases. En comparaison avec un inhibiteur synthétique spécifique à Met, le SU11274, les différents flavonols ont démontré des IC<sub>50</sub> à l'intérieur d'un ordre de grandeur, suggérant que de faibles concentrations en flavonols peuvent avoir un impact sur la migration cellulaire *in vivo*. Tous les flavonols, à l'exception du quercitrin, ainsi que le SU11274, ont été en mesure de prévenir les changements morphologiques induits par la signalisation HGF/Met sur les cellules de médulloblastome lors du processus de migration cellulaire. Ces résultats suggèrent que l'inhibition de Met par les flavonols et le SU11274 affecte également la réorganisation du cytosquelette d'actine impliquée dans la migration cellulaire.

Ensemble, ces résultats démontrent que les anthocyanes et les flavonols, de par leur action inhibitrice sur différents récepteurs à tyrosine kinase, sont en mesure d'entraver certaines étapes clés des processus d'angiogenèse et de formation de métastases et ce, avec une efficacité à des concentrations autour d'un ordre de grandeur supérieure à celle de différents inhibiteurs spécifiques synthétiques.

#### **4.2 Mécanismes d'action probables des flavonoïdes sur les récepteurs PDGFR- $\beta$ et Met**

Malgré que les flavonoïdes soient documentés comme étant des inhibiteurs particulièrement efficaces de nombreux récepteurs à tyrosine kinase responsables de la cancérogenèse, leurs mécanismes d'action demeurent encore aujourd'hui du domaine spéculatif pour plusieurs d'entre eux. Parmi les différents mécanismes d'action possibles, la modulation de l'expression génique des récepteurs ou une interaction avec le site de liaison de l'ATP semblent des hypothèses plus plausibles en ce qui concerne les molécules étudiées dans le cadre du présent travail.

Certains flavonoïdes ont démontré la capacité d'inhiber l'expression génique de plusieurs récepteurs à tyrosine kinase. C'est le cas d'un extrait riche en catéchines du thé vert qui a inhibé l'expression de VEGFR-1 et VEGFR-2 dans les cellules HUVEC (Kojima-Yuasa *et al.*, 2003), de l'EGCG qui a inhibé l'expression de PDGFR- $\beta$  dans des cellules de rat (Chen et Zhang, 2003), ou encore de la quercétine qui a inhibé l'expression de ERBB-2 dans les cellules de cancer du sein SK-Br3 (Jeong *et al.*, 2008). Cependant, toutes ces études ont un point en commun; elles utilisent des concentrations très élevées en flavonoïdes, pouvant atteindre des 200  $\mu$ M dans le cas de la quercétine, et impliquent des temps d'incubation très longs, allant jusqu'à trois jours. Ces conditions expérimentales ne correspondent pas à celles utilisées lors de nos études *in vitro*, qui privilégiaient des concentrations faibles et des temps d'incubation qui ne modifiaient pas les niveaux des différents récepteurs, comme en témoignent les nombreux contrôles effectués en immunobuvardage de type Western (se référer aux figure 2.1 et 3.2). Cependant, il est

possible qu'un effet des anthocyanes sur l'expression de PDGFR- $\beta$  ou d'autres récepteurs responsables de l'angiogenèse ait contribué à l'effet antiangiogénique de ces molécules lors des expériences de coculture ainsi que de celles *in vivo*. L'ajout répété de concentration élevée de delphinidine sur plusieurs jours lors des essais de coculture a pu affecter les niveaux en PDGFR- $\beta$  à la surface des cellules musculaires lisses, tout comme la présence continue des extraits de baies à l'intérieur des implants de matrigel, ou encore la présence constante d'anthocyanes dans le corps de la souris suite au gavage. Malgré que cette hypothèse soit théoriquement acceptable, un autre mécanisme, celui-là plus probable pourrait être en cause.

Quelques études ont démontré la capacité de certains polyphénols issus des plantes à interagir directement avec le site de liaison de l'ATP sur les récepteurs à tyrosine kinase, empêchant la signalisation induite par ces derniers. C'est le cas de l'acide tannique et de l'EGCG qui inhibent de cette façon l'activité kinasique de ERBB-1 (Yang *et al.*, 2006), et de l'IGFR-I (Li *et al.*, 2007) respectivement. Une autre étude a démontré que ce mécanisme serait également en cause dans le potentiel inhibiteur de la quercétine envers la PI3K (Walker *et al.*, 2000). Dans le cadre de ces recherches, la delphinidine et les flavonols ont démontré un potentiel inhibiteur similaire à des inhibiteurs de tyrosine kinase synthétiques tels que le Gleevec et le SU11274. Ainsi, ce fort potentiel inhibiteur, couplé à une ressemblance structurale avec l'EGCG et la quercétine, suggère qu'un tel mécanisme pourrait être en cause dans l'inhibition des récepteurs à tyrosine kinase PDGFR- $\beta$  et Met.

#### 4.3 Biodisponibilité

Les anthocyanes sont présents en très grande quantité dans certaines diètes. Ainsi, une portion de 200 g d'aubergine ou de raisins noirs peut procurer jusqu'à 1500 mg d'anthocyanes, tandis qu'une portion de 100 g de baies peut quant à elle en fournir jusqu'à 500 mg. La forte proportion d'anthocyanes dans certains aliments rend envisageable un apport journalier de quelques centaines de milligrammes. Ainsi, l'apport quotidien en anthocyanes est évalué à 82 mg chez la population finlandaise où les baies, le vin rouge et



l'agent colorant E163 (colorant issu de l'extraction des différents anthocyanes à partir des fruits et légumes) en représentent les sources principales. Plusieurs études concernant la biodisponibilité des anthocyanes chez l'humain suite à l'ingestion de baies entières, d'extraits de baies ou de concentrés ont été effectuées. Malgré des quantités d'anthocyanes relativement élevées, variant de 150 mg à 2 g dans les portions, seulement de faibles concentrations plasmatiques de l'ordre de 10 à 50 nmol/L de sang ont été observées. De plus, les anthocyanes ont été rapidement absorbés et éliminés, résultant en une biodisponibilité relativement faible. Cependant, ces résultats sont probablement sous-estimés pour deux raisons : (1) certains métabolites importants pourraient avoir été ignorés et (2) les méthodes utilisées pour l'analyse des métabolites d'anthocyanes ne sont pas au point et concourent même à la dégradation de plusieurs d'entre eux. Ainsi, l'utilisation d'anthocyanes marqués lors des prochains tests, couplés à l'utilisation de différentes méthodes d'analyses favorisant la conservation des métabolites d'anthocyanes, permettraient l'identification complète de tous les métabolites et donc une meilleure évaluation de la biodisponibilité chez l'humain (Manach *et al.*, 2005).

L'apport quotidien en flavonols d'origine alimentaire est estimé entre 20-35 mg (Manach *et al.*, 2005), la quercétine étant la principale représentante (16 mg/jour, sous forme aglycone) (Hertog *et al.*, 1993). Naturellement présente sous forme de glucoside ou encore sous différentes formes de glycosides, la quercétine doit être soit hydrolysée par les enzymes intestinales ou par la microflore du côlon avant d'être absorbée (Manach *et al.*, 2004). La quercétine est un flavonoïde particulièrement intéressant puisque des concentrations plasmatiques de l'ordre du micromolaire sont atteignables par l'alimentation. Ainsi, Graefe *et al.* ont démontré qu'un supplément composé de 160 g d'oignons broyés et homogénéisés, procurant 331  $\mu$ M de quercétine sous forme glucosylé (équivalent à 100 mg sous forme aglycone), était suffisant pour observer une concentration plasmatique maximale en quercétine de 7,6  $\mu$ moles/L chez l'humain (Graefe *et al.*, 2001). De plus, l'élimination des métabolites de la quercétine s'effectue de façon relativement lente, avec des temps de demi-vie variant de 11 à 28 h. Cette caractéristique est particulièrement intéressante puisqu'elle permettrait l'accumulation plasmatique de ce flavonol suite à une ingestion répétée lors des différents repas de la journée (Manach *et al.*, 2005).

#### 4.4 Le passage de la barrière hémato-encéphalique

La barrière hémato-encéphalique ou blood-brain barrier (BBB) représente un obstacle de taille dans le traitement des tumeurs du système nerveux central. Malgré que l'épaisseur des cellules endothéliales, composant le réseau de capillaires du cerveau, ne soit que d'environ 200 à 300 nm, la perméabilité de la BBB est l'une des plus restrictives de toutes les membranes biologiques connues. Ainsi, la forte cohésion des cellules endothéliales, excluant les molécules de plus de 500 Da, les nombreuses enzymes produites par les différentes cellules formant les microcapillaires et un système de transport actif élaboré protègent le cerveau de la plupart des substances indésirables (Pardridge, 2002). Dû à leur poids moléculaire élevé, les anticorps monoclonaux élaborés pour le traitement du cancer ne traversent généralement pas la BBB et doivent être dispensés de manière intra-tumorale (Butowski et Chang, 2005). Afin de pallier à ce problème, un groupe de l'Université Harvard a mis au point une méthode non invasive utilisant les ultrasons, afin de dilater la BBB et de permettre la livraison au cerveau du Herceptin (trastuzumab), un anticorps monoclonal humanisé inhibiteur de ERBB-2 chez la souris (Kinoshita *et al.*, 2006). Cependant, la taille élevée des anticorps rend cette approche moins intéressante, car ceux-ci pénètrent probablement moins bien les tissus, sont moins bien retenus dans la tumeur et restent en circulation dans le sang plus longtemps que les petites molécules, telles que les inhibiteurs de récepteurs à tyrosine kinase (Imai et Takaoka, 2006).

Comme les petites molécules développées pour le traitement du cancer, les flavonoïdes sont de très petite taille et nombre d'entre eux représentent des candidats intéressants dans le traitement des tumeurs du système nerveux central. Ainsi, la quercétine a démontré lors d'expériences *in vitro* et *in situ* qu'il était en mesure de passer la BBB et d'entrer dans les différentes régions du cerveau en tant que substrat de la P-glycoprotéine, une protéine d'importance impliquée dans le transport actif de la BBB (Youdim *et al.*, 2004). Ces résultats sont corroborés par des études chez les animaux qui ont démontré que d'autres flavonoïdes, telle la catéchine du thé vert EGCG, sont en mesure d'atteindre le cerveau suite à une administration orale chez la souris (Suganuma *et al.*, 1998). Le gavage chez le rat d'extraits de mûres (Talavera *et al.*, 2005) ou de bleuets (Andres-Lacueva *et al.*, 2005), riches

en anthocyanidines, a également démontré une localisation intracérébrale de ces molécules. Ensemble, ces résultats suggèrent que la quercétine ainsi que d'autres flavonoïdes d'origine alimentaire, tels que les anthocyanidines, seraient en mesure d'atteindre le cerveau humain lorsqu'ingérés oralement.

#### 4.5 Relevance physiologique

Ces données suggèrent fortement que l'effet *in vitro* et *in vivo* observé chez les anthocyanes et les flavonols pourrait avoir une relevance physiologique significative sur les médulloblastomes chez l'humain. En effet, le potentiel inhibiteur de la delphinidine sur la phosphorylation de PDGFR- $\beta$  est très rapide et seulement d'un ordre de grandeur inférieur à celui du Gleevec, un inhibiteur synthétique utilisé dans le traitement de la leucémie myéloïde chronique. De plus, l'ingestion orale chez la souris d'un extrait de baies riches en anthocyanes freine de 40 % la croissance tumorale dans un modèle de xénogreffe. Les flavonols ont démontré un potentiel inhibiteur sur Met comparable à celui d'un autre inhibiteur synthétique (le SU11274), et son inhibition ou celle de l'activation de Akt induite par Met par la quercétine s'observe à des concentrations atteignables par l'alimentation (IC<sub>50</sub> de 10  $\mu$ M pour Met et 2,5  $\mu$ M pour Akt).

En fait, l'insertion de fruits et de légumes variés dans notre alimentation tout au long de la journée permet l'accumulation des flavonoïdes dans la circulation sanguine et l'atteinte de concentrations plasmatiques pouvant jouer un rôle physiologique dans la prévention du cancer (Manach *et al.*, 2005). De plus, comme l'angiogenèse tumorale est caractérisée par des vaisseaux immatures, comparativement aux vaisseaux sains, de faibles concentrations d'un inhibiteur sont suffisantes afin d'inhiber le processus pathologique, sans toutefois interférer avec le phénomène physiologique (Jain, 2005). En outre, l'effet *in vivo* de l'extrait de baies riches en anthocyanes sur la croissance tumorale a été observé à des concentrations 25 fois inférieures à la concentration où les premiers effets secondaires sont observés chez le rat (Bagchi *et al.*, 2006). Une revue de littérature complète, incluant les études sur l'humain, a

également conclu que le flavonol le plus étudié, la quercétine, était dépourvu de tout effet secondaire indésirable aux concentrations ingérées lors des repas (Harwood *et al.*, 2007).

Bien que l'effet chimiopréventif des polyphénols sur les tumeurs pédiatriques soit encore aujourd'hui peu compris, il est intéressant de noter qu'une bonne diète maternelle, incluant une consommation élevée de fruits et de légumes pendant la grossesse, a démontré sous une forme dose-réponse une forte protection envers le risque de tumeurs cérébrales pédiatriques (Bunin *et al.*, 1993). À l'inverse, une forte consommation d'aliments mauvais pour la santé, tels que les frites, a démontré une augmentation significative des risques de tumeurs cérébrales pédiatriques (Bunin *et al.*, 2005). Nos résultats suggèrent que, considérant le fort risque de récurrence après 5 ans pour les patients survivants de médulloblastome (près de 40 %), une diète riche en flavonoïdes, particulièrement en anthocyanes et en flavonols, pourrait jouer un rôle crucial dans la prévention secondaire de ces tumeurs.

#### **4.6 Approche multi-inhibitrice dans la prévention et le traitement du cancer**

En fait, la prévention primaire et secondaire du cancer par l'alimentation est très près de la méthode préconisée actuellement, favorisant l'utilisation d'une combinaison d'inhibiteurs spécifiques et une approche métronomique dans le traitement du cancer. Actuellement, les chercheurs et médecins privilégient différentes combinaisons d'inhibiteurs de l'angiogenèse (ex : anti-VEGF ou anti-VEGFR-2) avec des inhibiteurs des récepteurs de la famille de ERBB dans le traitement du cancer (Folkman, 2006 ; Herbst *et al.*, 2007 ; Sandler et Herbst, 2006 ; Shibuya *et al.*, 2007). Les inhibiteurs de l'angiogenèse seraient même envisagés comme une médication de première ligne dans le traitement du cancer puisqu'ils sensibiliseraient la tumeur aux radiations ionisantes, permettant l'usage de doses moins dangereuses pour le patient (Folkman et Camphausen, 2001). Cependant, plusieurs de ces inhibiteurs, autant les petites molécules inhibitrices de récepteurs à tyrosine kinase que les anticorps monoclonaux humanisés (incluant entre autres le Gleevec (imatinib), le Tarceva (erlotinib), l'Herceptin (trastuzumab) ou encore le Sutent (sunitinib)) démontrent des effets secondaires très graves, dont une cardiotoxicité pouvant mener à la mort. Pour pallier à ce

problème, les chercheurs suggèrent l'utilisation de plusieurs inhibiteurs à plus faibles doses pour traiter un cancer particulier et ainsi diminuer les effets toxiques sur le cœur (Chu *et al.*, 2007 ; Force, Krause et Van Etten, 2007 ; Kerkela *et al.*, 2006).

Les divers composés bioactifs issus de l'alimentation ont la caractéristique d'agir généralement sur plus d'une cible thérapeutique. Cette caractéristique est souvent considérée comme un désavantage par les chercheurs qui peinent à isoler les différentes variables dans un système expérimental. Cependant, il s'agit d'un avantage certain lorsqu'il est question de prévention de maladies telles que le cancer. En effet, la pléiotropie des mécanismes d'action de chacun des nutraceutiques présents dans l'alimentation, couplée à leur multiplicité dans chacun des aliments, permettent une synergie qui réduit les risques de développer des résistances liées à l'émergence de voies compensatoires (Gescher, Sharma et Steward, 2001). En plus de l'effet en prévention primaire, les nutraceutiques, même en petite concentration, permettent d'affaiblir la tumeur et de la sensibiliser aux différents traitements de chimiothérapie (Russo, 2007). En fait, plusieurs molécules bioactives entraînent même des réponses biologiques à des concentrations plasmatiques insuffisantes pour permettre toute conclusion dans les systèmes expérimentaux *in vitro* actuels, soulignant notre incapacité, encore aujourd'hui, à saisir tout le potentiel de ces molécules et l'importance de poursuivre des recherches à leur sujet (Aggarwal et Shishodia, 2006).

Par contre, les divers composés bioactifs issus de l'alimentation ont tous la capacité d'être néfastes pour la santé, le principe de base en toxicologie stipulant que « la dose définit le poison » s'appliquant également à ces molécules. Ainsi, les effets antimutagéniques et antioxydants de la génistéine, isoflavone du soya appartenant au vaste groupe des flavonoïdes, sont remplacés par des effets entraînant l'inhibition de la topoisomérase II et l'endommagement de l'ADN en tests *in vitro* lorsqu'utilisé en concentrations supérieures à 5  $\mu\text{M}$  (Klein et King, 2007). Cependant, ces effets négatifs ne sont pas transposable chez l'humain puisque la concentration plasmatique en génistéine demeure de l'ordre de 7-18 nM chez les individus consommant une diète occidentale standard (Safford *et al.*, 2003) et n'a été en mesure d'atteindre que 700 nM dans le cadre d'une étude clinique impliquant une diète contenant un apport élevé en soya pendant 10 semaines (Wiseman *et al.*, 2004). À l'instar de

la génistéines, les différents composés bioactifs issus de l'alimentation sont parfaitement sécuritaires aux concentrations physiologiques résultant d'une diète normale, mais possèdent tous le potentiel d'être néfaste pour la santé, lorsque pris en excès sans suivi médical, par exemple sous forme de suppléments ou de produits de santé naturels.

## CHAPITRE V

### CONCLUSION ET PROSPECTIVES

Les résultats obtenus lors de cette étude montrent pour la première fois que la delphinidine est en mesure d'inhiber l'angiogenèse tumorale non seulement par un effet inhibiteur sur VEGFR-2, mais également sur PDGFR- $\beta$ . Cet effet combiné de la delphinidine sur ces deux récepteurs cruciaux dans le processus d'angiogenèse est certainement responsable des effets antiangiogéniques et antitumoraux de cette molécule. De plus, la très grande efficacité de l'extrait de baies *in vivo* suggère également une activité d'autres anthocyanes ou du moins une synergie entre ceux-ci et la delphinidine. Considérant que les anthocyanes sont en mesure de traverser la BBB, on peut supposer que l'effet inhibiteur de ces molécules sur PDGFR- $\beta$  est également retrouvé au niveau du réseau de capillaires du cerveau, qui lui aussi, est stabilisé par des cellules musculaires lisses et des péricytes (Girouard et Iadecola, 2006). Aussi, les médulloblastomes hautement métastatiques expriment le récepteur PDGFR- $\beta$  qui, en réponse au PDGF-BB sécrété par les cellules endothéliales, induit la survie et la migration cellulaire chez les cellules tumorales (Gilbertson et Clifford, 2003), faisant des médulloblastomes une cible potentielle pour les anthocyanes.

Nous avons également démontré pour la première fois que les flavonoïdes de la sous-classe des flavonols, soit la quercétine, la myricétine et le kaempferol, sont en mesure d'entraver la migration cellulaire de cellules de médulloblastomes par un effet inhibiteur sur Met. De ces résultats, ceux concernant la quercétine sont particulièrement intéressants. En effet, puisque cette molécule est largement répandue dans les aliments, il est possible d'atteindre des concentrations plasmatiques de quercétine de l'ordre de quelques micromolaires par notre alimentation, soit des concentrations équivalentes à celles actives *in vitro*. Puisque la quercétine est en mesure de traverser la BBB, il est probable que cet effet antimétastatique soit applicable chez l'humain et s'ajoute ainsi aux multiples cibles moléculaires de ce flavonol (Murakami, Ashida et Terao, 2008).

Récemment, des cellules souches cérébrales cancéreuses ont été isolées à partir de médulloblastomes. Ces cellules sont en mesure de se différencier *in vitro* et de reproduire les phénotypes cellulaires identiques à ceux retrouvés *in situ* (Singh *et al.*, 2003). À l'image des cellules souches cérébrales cancéreuses issues des glioblastomes (Singh *et al.*, 2004), celles-ci expriment un marqueur commun, soit la protéine membranaire CD133 (Mizrak, Brittan et Alison, 2008). Ces cellules conservent leur phénotype « souche » grâce aux conditions particulières du microenvironnement prévalent au sein des niches vasculaires cérébrales où elles se situent (Annabi *et al.*, 2008). Ces niches miment les conditions retrouvées dans les niches des cellules souches cérébrales normales et permettent ainsi le renouvellement des cellules souches cérébrales cancéreuses (Gilbertson et Rich, 2007). Ces découvertes ouvrent sur de nouvelles et excitantes avenues. Quel est l'impact des nutraceutiques sur les cellules souches cérébrales cancéreuses CD133<sup>+</sup> dans des modèles orthotopiques? Est-ce que la niche vasculaire cérébrale des cellules souches cancéreuses est une cible intéressante pour les nutraceutiques? Afin de maintenir les recherches sur l'alimentation et les cancers du cerveau à la frontière de nos connaissances, il est essentiel de s'intéresser à ces questions dans un avenir rapproché.



## RÉFÉRENCES

- Adhami, Vaqar Mustafa, Imtiaz Ahmad Siddiqui, Nihal Ahmad, Sanjay Gupta et Hasan Mukhtar. 2004. «Oral Consumption of Green Tea Polyphenols Inhibits Insulin-Like Growth Factor-I-Induced Signaling in an Autochthonous Mouse Model of Prostate Cancer». *Cancer Res.* vol. 64, no 23, p. 8715-8722. En ligne.  
<<http://cancerres.aacrjournals.org/cgi/content/abstract/64/23/8715>>.
- Aggarwal, B. B., et S. Shishodia. 2006. «Molecular targets of dietary agents for prevention and therapy of cancer». *Biochem Pharmacol.* vol. 71, no 10, p. 1397-1421. En ligne.  
<[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=16563357](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=16563357)>.
- Ahn, H. Y., K. R. Hadizadeh, C. Seul, Y. P. Yun, H. Vetter et A. Sachinidis. 1999. «Epigallocatechin-3 gallate selectively inhibits the PDGF-BB-induced intracellular signaling transduction pathway in vascular smooth muscle cells and inhibits transformation of sis-transfected NIH 3T3 fibroblasts and human glioblastoma cells (A172)». *Mol Biol Cell.* vol. 10, no 4, p. 1093-1104. En ligne.  
<[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=10198059](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10198059)>.
- Alitalo, K., T. Tammela et T. V. Petrova. 2005. «Lymphangiogenesis in development and human disease». *Nature.* vol. 438, no 7070, p. 946-953. En ligne.  
<[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=16355212](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=16355212)>.
- Amagasaki, K., H. Kaneto, C. H. Heldin et J. Lennartsson. 2006. «c-Jun N-terminal kinase is necessary for platelet-derived growth factor-mediated chemotaxis in primary fibroblasts». *J Biol Chem.* vol. 281, no 31, p. 22173-22179. En ligne.  
<[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=16760468](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=16760468)>.
- Andres-Lacueva, C., B. Shukitt-Hale, R. L. Galli, O. Jauregui, R. M. Lamuela-Raventos et J. A. Joseph. 2005. «Anthocyanins in aged blueberry-fed rats are found centrally and may enhance memory». *Nutr Neurosci.* vol. 8, no 2, p. 111-120. En ligne.  
<[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=16053243](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=16053243)>.
- Annabi, B., S. Rojas-Sutterlin, C. Laflamme, M. P. Lachambre, Y. Rolland, H. Sartelet et R. Beliveau. 2008. «Tumor environment dictates medulloblastoma cancer stem cell expression and invasive phenotype». *Mol Cancer Res.* vol. 6, no 6, p. 907-916. En ligne.  
<[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=18567795](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=18567795)>.

- Annabi, B., S. Rojas-Sutterlin, M. Laroche, M. P. Lachambre, R. Moundjian et R. Beliveau. 2008. «The diet-derived sulforaphane inhibits matrix metalloproteinase-9-activated human brain microvascular endothelial cell migration and tubulogenesis». *Mol Nutr Food Res*. vol. 52, no 6, p. 692-700. En ligne.  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=18435488](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=18435488).
- Atalay, M., G. Gordillo, S. Roy, B. Rovin, D. Bagchi, M. Bagchi et C. K. Sen. 2003. «Anti-angiogenic property of edible berry in a model of hemangioma». *FEBS Lett*. vol. 544, no 1-3, p. 252-257. En ligne.  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=12782326](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12782326) >.
- Ault, P. 2007. «Overview of second-generation tyrosine kinase inhibitors for patients with imatinib-resistant chronic myelogenous leukemia». *Clin J Oncol Nurs*. vol. 11, no 1, p. 125-129. En ligne.  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=17441403](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=17441403) >.
- Bachelder, R. E., A. Crago, J. Chung, M. A. Wendt, L. M. Shaw, G. Robinson et A. M. Mercurio. 2001. «Vascular endothelial growth factor is an autocrine survival factor for neuropilin-expressing breast carcinoma cells». *Cancer Res*. vol. 61, no 15, p. 5736-5740. En ligne.  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=11479209](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11479209) >.
- Bagchi, D., S. Roy, V. Patel, G. He, S. Khanna, N. Ojha, C. Phillips, S. Ghosh, M. Bagchi et C. K. Sen. 2006. «Safety and whole-body antioxidant potential of a novel anthocyanin-rich formulation of edible berries». *Mol Cell Biochem*. vol. 281, no 1-2, p. 197-209. En ligne.  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=16328973](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=16328973) >.
- Bagchi, D., C. K. Sen, M. Bagchi et M. Atalay. 2004. «Anti-angiogenic, antioxidant, and anti-carcinogenic properties of a novel anthocyanin-rich berry extract formula». *Biochemistry (Mosc)*. vol. 69, no 1, p. 75-80, 71 p preceding 75. En ligne.  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=14972022](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=14972022) >.
- Bean, J., C. Brennan, J. Y. Shih, G. Riely, A. Viale, L. Wang, D. Chitale, N. Motoi, J. Szoke, S. Broderick, M. Balak, W. C. Chang, C. J. Yu, A. Gazdar, H. Pass, V. Rusch, W. Gerald, S. F. Huang, P. C. Yang, V. Miller, M. Ladanyi, C. H. Yang et W. Pao. 2007. «MET amplification occurs with or without T790M mutations in EGFR mutant lung tumors with acquired resistance to gefitinib or erlotinib». *Proc Natl Acad Sci U S A*. vol. 104, no 52, p. 20932-20937. En ligne.

[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=18093943](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=18093943) >.

Benjamin, L. E., D. Golijanin, A. Itin, D. Podes et E. Keshet. 1999. «Selective ablation of immature blood vessels in established human tumors follows vascular endothelial growth factor withdrawal». *J Clin Invest.* vol. 103, no 2, p. 159-165. En ligne.  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=9916127](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9916127) >.

Benjamin, L. E., I. Hemo et E. Keshet. 1998. «A plasticity window for blood vessel remodelling is defined by pericyte coverage of the preformed endothelial network and is regulated by PDGF-B and VEGF». *Development.* vol. 125, no 9, p. 1591-1598. En ligne.  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=9521897](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9521897) >.

Bergers, G., S. Song, N. Meyer-Morse, E. Bergsland et D. Hanahan. 2003. «Benefits of targeting both pericytes and endothelial cells in the tumor vasculature with kinase inhibitors». *J Clin Invest.* vol. 111, no 9, p. 1287-1295. En ligne.  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=12727920](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12727920) >.

Bergers, Gabriele, et Laura E. Benjamin. 2003. «Tumorigenesis and the angiogenic switch». *Nat Rev Cancer.* vol. 3, no 6, p. 401-410. En ligne.  
<http://dx.doi.org/10.1038/nrc1093> >.

Bergsten, E., M. Uutela, X. Li, K. Pietras, A. Ostman, C. H. Heldin, K. Alitalo et U. Eriksson. 2001. «PDGF-D is a specific, protease-activated ligand for the PDGF beta-receptor». *Nat Cell Biol.* vol. 3, no 5, p. 512-516. En ligne.  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=11331881](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11331881) >.

Betsholtz, C. 2003. «Biology of platelet-derived growth factors in development». *Birth Defects Res C Embryo Today.* vol. 69, no 4, p. 272-285. En ligne.  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=14745969](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=14745969) >.

Betsholtz, C., A. Johnsson, C. H. Heldin, B. Westermark, P. Lind, M. S. Urdea, R. Eddy, T. B. Shows, K. Philpott, A. L. Mellor et al. 1986. «cDNA sequence and chromosomal localization of human platelet-derived growth factor A-chain and its expression in tumour cell lines». *Nature.* vol. 320, no 6064, p. 695-699. En ligne.  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=3754619](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=3754619) >.

Bigelow, R. L. H., et J. A. Cardelli. 2006. «The green tea catechins, (-)-Epigallocatechin-3-gallate (EGCG) and (-)-Epicatechin-3-gallate (ECG), inhibit HGF/Met signaling in



- immortalized and tumorigenic breast epithelial cells». *Oncogene*. vol. 25, no 13, p. 1922-1930. En ligne. <<http://dx.doi.org/10.1038/sj.onc.1209227>>.
- Birchmeier, Carmen, Walter Birchmeier, Ermanno Gherardi et George F. Vande Woude. 2003. «Met, metastasis, motility and more». *Nat Rev Mol Cell Biol*. vol. 4, no 12, p. 915-925. En ligne. <<http://dx.doi.org/10.1038/nrm1261>  
[http://www.nature.com/nrm/journal/v4/n12/supinfo/nrm1261\\_S1.html](http://www.nature.com/nrm/journal/v4/n12/supinfo/nrm1261_S1.html)>.
- Black, W. C., et H. G. Welch. 1993. «Advances in diagnostic imaging and overestimations of disease prevalence and the benefits of therapy». *N Engl J Med*. vol. 328, no 17, p. 1237-1243. En ligne.  
<[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=8464435](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8464435)>.
- Block, G., B. Patterson et A. Subar. 1992. «Fruit, vegetables, and cancer prevention: a review of the epidemiological evidence». *Nutr Cancer*. vol. 18, no 1, p. 1-29. En ligne.  
<[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=1408943](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=1408943)>.
- Boccaccio, C., et P. M. Comoglio. 2006. «Invasive growth: a MET-driven genetic programme for cancer and stem cells». *Nat Rev Cancer*. vol. 6, no 8, p. 637-645. En ligne.  
<[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=16862193](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=16862193)>.
- Bomser, J. A., K. W. Singletary, M. A. Wallig et M. A. Smith. 1999. «Inhibition of TPA-induced tumor promotion in CD-1 mouse epidermis by a polyphenolic fraction from grape seeds». *Cancer Lett*. vol. 135, no 2, p. 151-157. En ligne.  
<[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=10096423](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10096423)>.
- Bomser, J., D. L. Madhavi, K. Singletary et M. A. Smith. 1996. «In vitro anticancer activity of fruit extracts from *Vaccinium* species». *Planta Med*. vol. 62, no 3, p. 212-216. En ligne.  
<[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=8693031](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8693031)>.
- Boots, A. W., G. R. Haenen et A. Bast. 2008. «Health effects of quercetin: from antioxidant to nutraceutical». *Eur J Pharmacol*. vol. 585, no 2-3, p. 325-337. En ligne.  
<[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=18417116](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=18417116)>.
- Bravo, L. 1998. «Polyphenols: chemistry, dietary sources, metabolism, and nutritional significance». *Nutr Rev*. vol. 56, no 11, p. 317-333. En ligne.  
<[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=9838798](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9838798)>.

- Browder, T., C. E. Butterfield, B. M. Kraling, B. Shi, B. Marshall, M. S. O'Reilly et J. Folkman. 2000. «Antiangiogenic scheduling of chemotherapy improves efficacy against experimental drug-resistant cancer». *Cancer Res.* vol. 60, no 7, p. 1878-1886. En ligne.  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=10766175](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10766175) >.
- Brown, E. B., R. B. Campbell, Y. Tsuzuki, L. Xu, P. Carmeliet, D. Fukumura et R. K. Jain. 2001. «In vivo measurement of gene expression, angiogenesis and physiological function in tumors using multiphoton laser scanning microscopy». *Nat Med.* vol. 7, no 7, p. 864-868. En ligne.  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=11433354](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11433354) >.
- Bunin, G. R., L. H. Kushi, P. R. Gallagher, L. B. Rorke-Adams, M. L. McBride et A. Cnaan. 2005. «Maternal diet during pregnancy and its association with medulloblastoma in children: a children's oncology group study (United States)». *Cancer Causes Control.* vol. 16, no 7, p. 877-891. En ligne.  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=16132798](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=16132798) >.
- Bunin, Greta R., Rene R. Kuijten, Jonathan D. Buckley, Lucy B. Rorke et Anna T. Meadows. 1993. «Relation between Maternal Diet and Subsequent Primitive Neuroectodermal Brain Tumors in Young Children». *N Engl J Med.* vol. 329, no 8, p. 536-541. En ligne. <<http://content.nejm.org/cgi/content/abstract/329/8/536>>.
- Butowski, N., et S. M. Chang. 2005. «Small molecule and monoclonal antibody therapies in neurooncology». *Cancer Control.* vol. 12, no 2, p. 116-124. En ligne.  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=15855895](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15855895) >.
- Byers, L. A., et J. V. Heymach. 2007. «Dual targeting of the vascular endothelial growth factor and epidermal growth factor receptor pathways: rationale and clinical applications for non-small-cell lung cancer». *Clin Lung Cancer.* vol. 8 Suppl 2, p. S79-85. En ligne.  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=17382029](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=17382029) >.
- Byrne, A. M., D. J. Bouchier-Hayes et J. H. Harmey. 2005. «Angiogenic and cell survival functions of vascular endothelial growth factor (VEGF)». *J Cell Mol Med.* vol. 9, no 4, p. 777-794. En ligne.  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=16364190](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=16364190) >.

- Cao, R., E. Brakenhielm, R. Pawliuk, D. Wariaro, M. J. Post, E. Wahlberg, P. Leboulch et Y. Cao. 2003. «Angiogenic synergism, vascular stability and improvement of hind-limb ischemia by a combination of PDGF-BB and FGF-2». *Nat Med.* vol. 9, no 5, p. 604-613. En ligne.  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=12669032](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12669032) >.
- Carmeliet, P. 2000. «Mechanisms of angiogenesis and arteriogenesis». *Nat Med.* vol. 6, no 4, p. 389-395. En ligne.  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=10742145](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10742145) >.
- , 2003. «Angiogenesis in health and disease». *Nat Med.* vol. 9, no 6, p. 653-660. En ligne.  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=12778163](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12778163) >.
- , 2005. «Angiogenesis in life, disease and medicine». *Nature.* vol. 438, no 7070, p. 932-936. En ligne.  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=16355210](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=16355210) >.
- Carpenter, G., L. King, Jr. et S. Cohen. 1978. «Epidermal growth factor stimulates phosphorylation in membrane preparations in vitro». *Nature.* vol. 276, no 5686, p. 409-410. En ligne.  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=309559](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=309559) >.
- Chen, A., et L. Zhang. 2003. «The antioxidant (-)-epigallocatechin-3-gallate inhibits rat hepatic stellate cell proliferation in vitro by blocking the tyrosine phosphorylation and reducing the gene expression of platelet-derived growth factor-beta receptor». *J Biol Chem.* vol. 278, no 26, p. 23381-23389. En ligne.  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=12695518](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12695518) >.
- Chmielowiec, J., M. Borowiak, M. Morkel, T. Stradal, B. Munz, S. Werner, J. Wehland, C. Birchmeier et W. Birchmeier. 2007. «c-Met is essential for wound healing in the skin». *J Cell Biol.* vol. 177, no 1, p. 151-162. En ligne.  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=17403932](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=17403932) >.
- Chu, T. F., M. A. Rupnick, R. Kerkela, S. M. Dallabrida, D. Zurakowski, L. Nguyen, K. Woulfe, E. Pravda, F. Cassiola, J. Desai, S. George, J. A. Morgan, D. M. Harris, N. S. Ismail, J. H. Chen, F. J. Schoen, A. D. Van den Abbeele, G. D. Demetri, T. Force et M. H. Chen. 2007. «Cardiotoxicity associated with tyrosine kinase inhibitor sunitinib». *Lancet.* vol. 370, no 9604, p. 2011-2019. En ligne.



[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=18083403](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=18083403) >.

Citri, A., et Y. Yarden. 2006. «EGF-ERBB signalling: towards the systems level». *Nat Rev Mol Cell Biol.* vol. 7, no 7, p. 505-516. En ligne.  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=16829981](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=16829981) >.

Collins, I., et P. Workman. 2006. «New approaches to molecular cancer therapeutics». *Nat Chem Biol.* vol. 2, no 12, p. 689-700. En ligne.  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=17108987](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=17108987) >.

Collins, V. P. 2004. «Brain tumours: classification and genes». *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* vol. 75 Suppl 2, p. ii2-11. En ligne.  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=15146033](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15146033) >.

Cooper, C. S., M. Park, D. G. Blair, M. A. Tainsky, K. Huebner, C. M. Croce et G. F. Vande Woude. 1984. «Molecular cloning of a new transforming gene from a chemically transformed human cell line». *Nature.* vol. 311, no 5981, p. 29-33. En ligne.  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=6590967](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=6590967) >.

Cotchin, E. 1977. «A general survey of tumours in the horse». *Equine Vet J.* vol. 9, no 1, p. 16-21. En ligne.  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=319996](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=319996) >.

Coultas, L., K. Chawengsaksophak et J. Rossant. 2005. «Endothelial cells and VEGF in vascular development». *Nature.* vol. 438, no 7070, p. 937-945. En ligne.  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=16355211](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=16355211) >.

Crawford, John R., Tobey J. MacDonald et Roger J. Packer. 2007. «Medulloblastoma in childhood: new biological advances». *The Lancet Neurology.* vol. 6, no 12, p. 1073-1085. En ligne. <http://www.sciencedirect.com/science/article/B6X3F-4R5N1KM-H/1/b2247ac70df8f6ed68c976e0cf6da05> >.

Dahmen, R. P., A. Koch, D. Denkhäus, J. C. Tonn, N. Sorensen, F. Berthold, J. Behrens, W. Birchmeier, O. D. Wiestler et T. Pietsch. 2001. «Deletions of AXIN1, a component of the WNT/wingless pathway, in sporadic medulloblastomas». *Cancer Res.* vol. 61, no 19, p. 7039-7043. En ligne.  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=11585731](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11585731) >.

- Dancey, J. E., et H. X. Chen. 2006. «Strategies for optimizing combinations of molecularly targeted anticancer agents». *Nat Rev Drug Discov.* vol. 5, no 8, p. 649-659. En ligne. [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=16883303](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=16883303).
- de Kok, T. M., S. G. van Breda et M. M. Manson. 2008. «Mechanisms of combined action of different chemopreventive dietary compounds: a review». *Eur J Nutr.* vol. 47 Suppl 2, p. 51-59. En ligne. [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=18458834](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=18458834).
- Demeule, M., B. Annabi, J. Michaud-Levesque, S. Lamy et R. Beliveau. 2005. «Dietary prevention of cancer: anticancer and antiangiogenic properties of green tea polyphenols». *Med Chem Rev Online.* vol. 2, p. 49-58.
- Dias, S., K. Hattori, B. Heissig, Z. Zhu, Y. Wu, L. Witte, D. J. Hicklin, M. Tateno, P. Bohlen, M. A. Moore et S. Rafii. 2001. «Inhibition of both paracrine and autocrine VEGF/VEGFR-2 signaling pathways is essential to induce long-term remission of xenotransplanted human leukemias». *Proc Natl Acad Sci U S A.* vol. 98, no 19, p. 10857-10862. En ligne. [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=11553814](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11553814).
- Doll, R., et R. Peto. 1981. «The causes of cancer: quantitative estimates of avoidable risks of cancer in the United States today». *J Natl Cancer Inst.* vol. 66, no 6, p. 1191-1308. En ligne. [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=7017215](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=7017215).
- Dvorak, H. F. 2005. «Angiogenesis: update 2005». *J Thromb Haemost.* vol. 3, no 8, p. 1835-1842. En ligne. [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=16102050](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=16102050).
- Eaton, S. B., M. C. Pike, R. V. Short, N. C. Lee, J. Trussell, R. A. Hatcher, J. W. Wood, C. M. Worthman, N. G. Jones, M. J. Konner et al. 1994. «Women's reproductive cancers in evolutionary context». *Q Rev Biol.* vol. 69, no 3, p. 353-367. En ligne. [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=7972680](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=7972680).
- Engelman, J. A., K. Zejnullahu, T. Mitsudomi, Y. Song, C. Hyland, J. O. Park, N. Lindeman, C. M. Gale, X. Zhao, J. Christensen, T. Kosaka, A. J. Holmes, A. M. Rogers, F. Cappuzzo, T. Mok, C. Lee, B. E. Johnson, L. C. Cantley et P. A. Janne. 2007. «MET amplification leads to gefitinib resistance in lung cancer by activating ERBB3 signaling». *Science.* vol. 316, no 5827, p. 1039-1043. En ligne.



[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=17463250](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=17463250).

Erber, R., A. Thurnher, A. D. Katsen, G. Groth, H. Kerger, H. P. Hammes, M. D. Menger, A. Ullrich et P. Vajkoczy. 2004. «Combined inhibition of VEGF and PDGF signaling enforces tumor vessel regression by interfering with pericyte-mediated endothelial cell survival mechanisms». *FASEB J.* vol. 18, no 2, p. 338-340. En ligne.

[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=14657001](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=14657001) >.

Erlund, Iris. 2004. «Review of the flavonoids quercetin, hesperetin, and naringenin. Dietary sources, bioactivities, bioavailability, and epidemiology». *Nutrition Research.* vol. 24, no 10, p. 851-874. En ligne.

<http://www.sciencedirect.com/science/article/B6TB1-4F00BP2-7/2/43aa10d31e4541e2f243501b58292bb6> >.

Escudier, B., T. Eisen, W. M. Stadler, C. Szczylik, S. Oudard, M. Siebels, S. Negrier, C. Chevreau, E. Solska, A. A. Desai, F. Rolland, T. Demkow, T. E. Hutson, M. Gore, S. Freeman, B. Schwartz, M. Shan, R. Simantov et R. M. Bukowski. 2007. «Sorafenib in advanced clear-cell renal-cell carcinoma». *N Engl J Med.* vol. 356, no 2, p. 125-134. En ligne.

[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=17215530](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=17215530) >.

Escudier, B., A. Pluzanska, P. Koralewski, A. Ravaud, S. Bracarda, C. Szczylik, C. Chevreau, M. Filipek, B. Melichar, E. Bajetta, V. Gorbunova, J. O. Bay, I. Bodrogi, A. Jagiello-Gruszfeld et N. Moore. 2007. «Bevacizumab plus interferon alfa-2a for treatment of metastatic renal cell carcinoma: a randomised, double-blind phase III trial». *Lancet.* vol. 370, no 9605, p. 2103-2111. En ligne.

[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=18156031](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=18156031) >.

Esteve, F. J., V. Valero, D. Booser, L. T. Guerra, J. L. Murray, L. Pusztai, M. Cristofanilli, B. Arun, B. Esmali, H. A. Fritsche, N. Sneige, T. L. Smith et G. N. Hortobagyi. 2002. «Phase II study of weekly docetaxel and trastuzumab for patients with HER-2-overexpressing metastatic breast cancer». *J Clin Oncol.* vol. 20, no 7, p. 1800-1808. En ligne.

[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=11919237](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11919237) >.

Ezzell, C. 1998. «Starving tumors of their lifeblood». *Sci Am.* vol. 279, no 4, p. 33-34. En ligne.

[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=9768520](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9768520) >.

- Faivre, S., G. Demetri, W. Sargent et E. Raymond. 2007. «Molecular basis for sunitinib efficacy and future clinical development». *Nat Rev Drug Discov.* vol. 6, no 9, p. 734-745. En ligne.  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=17690708](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=17690708) >.
- Ferracini, R., P. Longati, L. Naldini, E. Vigna et P. M. Comoglio. 1991. «Identification of the major autophosphorylation site of the Met/hepatocyte growth factor receptor tyrosine kinase». *J. Biol. Chem.* vol. 266, no 29, p. 19558-19564. En ligne.  
<http://www.jbc.org/cgi/content/abstract/266/29/19558> >.
- Ferrara, N. 2004. «Vascular endothelial growth factor: basic science and clinical progress». *Endocr Rev.* vol. 25, no 4, p. 581-611. En ligne.  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=15294883](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15294883) >.
- Ferrara, N., et R. S. Kerbel. 2005. «Angiogenesis as a therapeutic target». *Nature.* vol. 438, no 7070, p. 967-974. En ligne.  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=16355214](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=16355214) >.
- Fillinger, M. F., L. N. Sampson, J. L. Cronenwett, R. J. Powell et R. J. Wagner. 1997. «Coculture of endothelial cells and smooth muscle cells in bilayer and conditioned media models». *J Surg Res.* vol. 67, no 2, p. 169-178. En ligne.  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=9073564](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9073564) >.
- Folkman, J. 1971. «Tumor angiogenesis: therapeutic implications». *N Engl J Med.* vol. 285, no 21, p. 1182-1186. En ligne.  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=4938153](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=4938153) >.
- , 1995. «Angiogenesis in cancer, vascular, rheumatoid and other disease». *Nat Med.* vol. 1, no 1, p. 27-31. En ligne.  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=7584949](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=7584949) >.
- , 1999. «Angiogenesis research: from laboratory to clinic». *Forum (Genova).* vol. 9, no 3 Suppl 3, p. 59-62. En ligne.  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=10607848](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10607848) >.
- , 2006. «Angiogenesis». *Annu Rev Med.* vol. 57, p. 1-18. En ligne.  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=16409133](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=16409133) >.

- , 2007. «Angiogenesis: an organizing principle for drug discovery?». *Nat Rev Drug Discov.* vol. 6, no 4, p. 273-286. En ligne.  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=17396134](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=17396134) >.
- Folkman, J., et K. Camphausen. 2001. «Cancer. What does radiotherapy do to endothelial cells?». *Science.* vol. 293, no 5528, p. 227-228. En ligne.  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=11452105](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11452105) >.
- Folkman, J., et R. Kalluri. 2004. «Cancer without disease». *Nature.* vol. 427, no 6977, p. 787. En ligne.  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=14985739](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=14985739) >.
- Force, T., D. S. Krause et R. A. Van Etten. 2007. «Molecular mechanisms of cardiotoxicity of tyrosine kinase inhibition». *Nat Rev Cancer.* vol. 7, no 5, p. 332-344. En ligne.  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=17457301](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=17457301) >.
- Fridrich, D., N. Teller, M. Esselen, G. Pahlke et D. Marko. 2008. «Comparison of delphinidin, quercetin and (-)-epigallocatechin-3-gallate as inhibitors of the EGFR and the ErbB2 receptor phosphorylation». *Mol Nutr Food Res.* vol. 52, no 7, p. 815-822. En ligne.  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=18618485](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=18618485) >.
- Fukumura, D., R. Xavier, T. Sugiura, Y. Chen, E. C. Park, N. Lu, M. Selig, G. Nielsen, T. Taksir, R. K. Jain et B. Seed. 1998. «Tumor induction of VEGF promoter activity in stromal cells». *Cell.* vol. 94, no 6, p. 715-725. En ligne.  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=9753319](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9753319) >.
- Gajjar, A., R. Hernan, M. Kocak, C. Fuller, Y. Lee, P. J. McKinnon, D. Wallace, C. Lau, M. Chintagumpala, D. M. Ashley, S. J. Kellie, L. Kun et R. J. Gilbertson. 2004. «Clinical, histopathologic, and molecular markers of prognosis: toward a new disease risk stratification system for medulloblastoma». *J Clin Oncol.* vol. 22, no 6, p. 984-993. En ligne.  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=14970185](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=14970185) >.
- Garcia-Closas, R., C. A. Gonzalez, A. Agudo et E. Riboli. 1999. «Intake of specific carotenoids and flavonoids and the risk of gastric cancer in Spain». *Cancer Causes Control.* vol. 10, no 1, p. 71-75. En ligne.  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=10334645](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10334645) >.



- Gasparini, G., R. Longo, M. Toi et N. Ferrara. 2005. «Angiogenic inhibitors: a new therapeutic strategy in oncology». *Nat Clin Pract Oncol.* vol. 2, no 11, p. 562-577. En ligne. [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=16270097](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=16270097) >.
- Gentile, Alessandra, Livio Trusolino et Paolo Comoglio. 2008. «The Met tyrosine kinase receptor in development and cancer». *Cancer and Metastasis Reviews.* vol. 27, no 1, p. 85-94. En ligne. <http://dx.doi.org/10.1007/s10555-007-9107-6>.
- Gerhardt, H., et C. Betsholtz. 2003. «Endothelial-pericyte interactions in angiogenesis». *Cell Tissue Res.* vol. 314, no 1, p. 15-23. En ligne. [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=12883993](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12883993) >.
- Gerhardt, Holger, et Christer Betsholtz. 2003. «Endothelial-pericyte interactions in angiogenesis». *Cell and Tissue Research.* vol. 314, no 1, p. 15-23. En ligne. <http://dx.doi.org/10.1007/s00441-003-0745-x> >.
- Gescher, Andreas J., Ricky A. Sharma et William P. Steward. 2001. «Cancer chemoprevention by dietary constituents: a tale of failure and promise». *Lancet Oncol.* vol. 2, no 6, p. 371-379. En ligne. <http://www.sciencedirect.com/science/article/B6W85-43F3M5T-S/2/fc540bfc631ba6b631fd4ac98055950f> >.
- Gilbertson, R. J., et S. C. Clifford. 2003. «PDGFRB is overexpressed in metastatic medulloblastoma». *Nat Genet.* vol. 35, no 3, p. 197-198. En ligne. [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=14593398](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=14593398) >.
- Gilbertson, R. J., S. C. Clifford, W. MacMeekin, W. Meekin, C. Wright, R. H. Perry, P. Kelly, A. D. Pearson et J. Lunec. 1998. «Expression of the ErbB-neuregulin signaling network during human cerebellar development: implications for the biology of medulloblastoma». *Cancer Res.* vol. 58, no 17, p. 3932-3941. En ligne. [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=9731505](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9731505) >.
- Gilbertson, R. J., et A. Gajjar. 2005. «Molecular biology of medulloblastoma: will it ever make a difference to clinical management?». *J Neurooncol.* vol. 75, no 3, p. 273-278. En ligne. [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=16195803](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=16195803) >.
- Gilbertson, R. J., R. H. Perry, P. J. Kelly, A. D. Pearson et J. Lunec. 1997. «Prognostic significance of HER2 and HER4 coexpression in childhood medulloblastoma».

- Cancer Res.* vol. 57, no 15, p. 3272-3280. En ligne.  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=9242460](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9242460) >.
- Gilbertson, R. J., et J. N. Rich. 2007. «Making a tumour's bed: glioblastoma stem cells and the vascular niche». *Nat Rev Cancer*. vol. 7, no 10, p. 733-736. En ligne.  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=17882276](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=17882276) >.
- Gilbertson, R., C. Wickramasinghe, R. Hernan, V. Balaji, D. Hunt, D. Jones-Wallace, J. Crolla, R. Perry, J. Lunec, A. Pearson et D. Ellison. 2001. «Clinical and molecular stratification of disease risk in medulloblastoma». *Br J Cancer*. vol. 85, no 5, p. 705-712. En ligne.  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=11531256](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11531256) >.
- Gilbertson, Richard J. 2004. «Medulloblastoma: signalling a change in treatment». *The Lancet Oncology*. vol. 5, no 4, p. 209-218. En ligne.  
<http://www.sciencedirect.com/science/article/B6W85-4C2RD6K-M/1/d673dd219229dc124e539bc34c7fd666> >.
- Gilhuis, H. J., J. A. van der Laak, J. Pomp, A. C. Kappelle, J. M. Gijtenbeek et P. Wesseling. 2006. «Three-dimensional (3D) reconstruction and quantitative analysis of the microvasculature in medulloblastoma and ependymoma subtypes». *Angiogenesis*. vol. 9, no 4, p. 201-208. En ligne.  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=17109194](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=17109194) >.
- Gingras, D., M. Gendron, D. Boivin, A. Moghrabi, Y. Theoret et R. Beliveau. 2004. «Induction of medulloblastoma cell apoptosis by sulforaphane, a dietary anticarcinogen from Brassica vegetables». *Cancer Lett.* vol. 203, no 1, p. 35-43. En ligne.  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=14670615](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=14670615) >.
- Giordano, S., C. Ponzetto, M. F. Di Renzo, C. S. Cooper et P. M. Comoglio. 1989. «Tyrosine kinase receptor indistinguishable from the c-met protein». *Nature*. vol. 339, no 6220, p. 155-156. En ligne.  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=2541345](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=2541345) >.
- Girouard, H., et C. Iadecola. 2006. «Neurovascular coupling in the normal brain and in hypertension, stroke, and Alzheimer disease». *J Appl Physiol*. vol. 100, no 1, p. 328-335. En ligne.  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=16357086](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=16357086) >.

- Glade Bender, J., E. M. Cooney, J. J. Kandel et D. J. Yamashiro. 2004. «Vascular remodeling and clinical resistance to antiangiogenic cancer therapy». *Drug Resist Updat.* vol. 7, no 4-5, p. 289-300. En ligne.  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=15533766](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15533766) >.
- Glossmann, H., P. Presek et E. Eigenbrodt. 1981. «Quercetin inhibits tyrosine phosphorylation by the cyclic nucleotide-independent, transforming protein kinase, pp60src». *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.* vol. 317, no 1, p. 100-102. En ligne.  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=6269001](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=6269001) >.
- Godichaud, S., K. Si-Tayeb, N. Auge, A. Desmouliere, C. Balabaud, B. Payraastre, A. Negre-Salvayre et J. Rosenbaum. 2006. «The grape-derived polyphenol resveratrol differentially affects epidermal and platelet-derived growth factor signaling in human liver myofibroblasts». *Int J Biochem Cell Biol.* vol. 38, no 4, p. 629-637. En ligne.  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=16343977](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=16343977) >.
- Graefe, E. U., J. Wittig, S. Mueller, A. K. Riethling, B. Uehleke, B. Drewelow, H. Pforte, G. Jacobasch, H. Derendorf et M. Veit. 2001. «Pharmacokinetics and bioavailability of quercetin glycosides in humans». *J Clin Pharmacol.* vol. 41, no 5, p. 492-499. En ligne.  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=11361045](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11361045) >.
- Graf, K., X. P. Xi, D. Yang, E. Fleck, W. A. Hsueh et R. E. Law. 1997. «Mitogen-activated protein kinase activation is involved in platelet-derived growth factor-directed migration by vascular smooth muscle cells». *Hypertension.* vol. 29, no 1 Pt 2, p. 334-339. En ligne.  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=9039124](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9039124) >.
- Greaves, M. 2007. «Darwinian medicine: a case for cancer». *Nat Rev Cancer.* vol. 7, no 3, p. 213-221. En ligne.  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=17301845](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=17301845) >.
- Greenwald, P., C. K. Clifford et J. A. Milner. 2001. «Diet and cancer prevention». *Eur J Cancer.* vol. 37, no 8, p. 948-965. En ligne.  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=11334719](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11334719) >.



- Grizzi, F., C. Weber et A. Di Ieva. 2008. «Antiangiogenic strategies in medulloblastoma: reality or mystery». *Pediatr Res*. vol. 63, no 5, p. 584-590. En ligne.  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=18427305](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=18427305) >.
- Grotzer, M. A., R. Wiewrodt, A. J. Janss, H. Zhao, A. Cnaan, L. N. Sutton, L. B. Rorke et P. C. Phillips. 2001. «High microvessel density in primitive neuroectodermal brain tumors of childhood». *Neuropediatrics*. vol. 32, no 2, p. 75-79. En ligne.  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=11414647](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11414647) >.
- Gupta, G. P., et J. Massague. 2006. «Cancer metastasis: building a framework». *Cell*. vol. 127, no 4, p. 679-695. En ligne.  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=17110329](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=17110329) >.
- Hainsworth, J. D., J. A. Sosman, D. R. Spigel, D. L. Edwards, C. Baughman et A. Greco. 2005. «Treatment of metastatic renal cell carcinoma with a combination of bevacizumab and erlotinib». *J Clin Oncol*. vol. 23, no 31, p. 7889-7896. En ligne.  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=16204015](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=16204015) >.
- Hammond, E. C., et H. Seidman. 1980. «Smoking and cancer in the United States». *Prev Med*. vol. 9, no 2, p. 169-174. En ligne.  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=7383981](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=7383981) >.
- Hanahan, D., et R. A. Weinberg. 2000. «The hallmarks of cancer». *Cell*. vol. 100, no 1, p. 57-70. En ligne.  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=10647931](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10647931) >.
- Harwood, M., B. Danielewska-Nikiel, J. F. Borzelleca, G. W. Flamm, G. M. Williams et T. C. Lines. 2007. «A critical review of the data related to the safety of quercetin and lack of evidence of in vivo toxicity, including lack of genotoxic/carcinogenic properties». *Food Chem Toxicol*. vol. 45, no 11, p. 2179-2205. En ligne.  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=17698276](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=17698276) >.
- Heldin, C. H., U. Eriksson et A. Ostman. 2002. «New members of the platelet-derived growth factor family of mitogens». *Arch Biochem Biophys*. vol. 398, no 2, p. 284-290. En ligne.  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=11831861](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11831861) >.

Hellstrom, M., M. Kalen, P. Lindahl, A. Abramsson et C. Betsholtz. 1999. «Role of PDGF-B and PDGFR-beta in recruitment of vascular smooth muscle cells and pericytes during embryonic blood vessel formation in the mouse». *Development*. vol. 126, no 14, p. 3047-3055. En ligne.

[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=10375497](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10375497) >.

Herbst, R. S., D. F. Bajorin, H. Bleiberg, D. Blum, D. Hao, B. E. Johnson, R. F. Ozols, G. D. Demetri, P. A. Ganz, M. G. Kris, B. Levin, M. Markman, D. Raghavan, G. H. Reaman, R. Sawaya, L. M. Schuchter, J. W. Sweetenham, L. T. Vahdat, E. E. Vokes, R. J. Winn et R. J. Mayer. 2006. «Clinical Cancer Advances 2005: major research advances in cancer treatment, prevention, and screening--a report from the American Society of Clinical Oncology». *J Clin Oncol*. vol. 24, no 1, p. 190-205. En ligne.

[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=16326753](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=16326753) >.

Herbst, R. S., D. H. Johnson, E. Mininberg, D. P. Carbone, T. Henderson, E. S. Kim, G. Blumenschein, Jr., J. J. Lee, D. D. Liu, M. T. Truong, W. K. Hong, H. Tran, A. Tsao, D. Xie, D. A. Ramies, R. Mass, S. Seshagiri, D. A. Eberhard, S. K. Kelley et A. Sandler. 2005. «Phase I/II trial evaluating the anti-vascular endothelial growth factor monoclonal antibody bevacizumab in combination with the HER-1/epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitor erlotinib for patients with recurrent non-small-cell lung cancer». *J Clin Oncol*. vol. 23, no 11, p. 2544-2555. En ligne.

[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=15753462](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15753462) >.

Herbst, R. S., V. J. O'Neill, L. Fehrenbacher, C. P. Belani, P. D. Bonomi, L. Hart, O. Melnyk, D. Ramies, M. Lin et A. Sandler. 2007. «Phase II study of efficacy and safety of bevacizumab in combination with chemotherapy or erlotinib compared with chemotherapy alone for treatment of recurrent or refractory non small-cell lung cancer». *J Clin Oncol*. vol. 25, no 30, p. 4743-4750. En ligne.

[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=17909199](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=17909199) >.

Hertog, M. G., P. C. Hollman, M. B. Katan et D. Kromhout. 1993. «Intake of potentially anticarcinogenic flavonoids and their determinants in adults in The Netherlands». *Nutr Cancer*. vol. 20, no 1, p. 21-29. En ligne.

[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=8415127](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8415127) >.

Heydarkhan-Hagvall, S., G. Helenius, B. R. Johansson, J. Y. Li, E. Mattsson et B. Risberg. 2003. «Co-culture of endothelial cells and smooth muscle cells affects gene expression of angiogenic factors». *J Cell Biochem*. vol. 89, no 6, p. 1250-1259. En ligne.

[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=12898522](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12898522) >.



- Holash, J., P. C. Maisonpierre, D. Compton, P. Boland, C. R. Alexander, D. Zagzag, G. D. Yancopoulos et S. J. Wiegand. 1999. «Vessel cooption, regression, and growth in tumors mediated by angiopoietins and VEGF». *Science*. vol. 284, no 5422, p. 1994-1998. En ligne.  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=10373119](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10373119).
- Homsy, J., et A. I. Daud. 2007. «Spectrum of Activity and Mechanism of Action of VEGF/PDGF Inhibitors». *Cancer Control*. vol. 14, no 3, p. 285-294. En ligne.  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=17615535](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=17615535).
- Hortobagyi, G. N. 1998. «Treatment of breast cancer». *N Engl J Med*. vol. 339, no 14, p. 974-984. En ligne.  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=9753714](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9753714).
- Hou, D. X. 2003. «Potential mechanisms of cancer chemoprevention by anthocyanins». *Curr Mol Med*. vol. 3, no 2, p. 149-159. En ligne.  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=12630561](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12630561).
- Huang, C., K. Jacobson et M. D. Schaller. 2004. «MAP kinases and cell migration». *J Cell Sci*. vol. 117, no Pt 20, p. 4619-4628. En ligne.  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=15371522](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15371522).
- Huber, H., A. Eggert, A. J. Janss, R. Wiewrodt, H. Zhao, L. N. Sutton, L. B. Rorke, P. C. Phillips et M. A. Grotzer. 2001. «Angiogenic profile of childhood primitive neuroectodermal brain tumours/medulloblastomas». *Eur J Cancer*. vol. 37, no 16, p. 2064-2072. En ligne.  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=11597385](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11597385).
- Hudis, C. A. 2007. «Trastuzumab--mechanism of action and use in clinical practice». *N Engl J Med*. vol. 357, no 1, p. 39-51. En ligne.  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=17611206](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=17611206).
- Huh, C. G., V. M. Factor, A. Sanchez, K. Uchida, E. A. Conner et S. S. Thorgeirsson. 2004. «Hepatocyte growth factor/c-met signaling pathway is required for efficient liver regeneration and repair». *Proc Natl Acad Sci U S A*. vol. 101, no 13, p. 4477-4482. En ligne.  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=15070743](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15070743).

- Hurwitz, H., L. Fehrenbacher, W. Novotny, T. Cartwright, J. Hainsworth, W. Heim, J. Berlin, A. Baron, S. Griffing, E. Holmgren, N. Ferrara, G. Fyfe, B. Rogers, R. Ross et F. Kabbinavar. 2004. «Bevacizumab plus irinotecan, fluorouracil, and leucovorin for metastatic colorectal cancer». *N Engl J Med.* vol. 350, no 23, p. 2335-2342. En ligne. [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=15175435](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15175435) >.
- Hussain, S. P., L. J. Hofseth et C. C. Harris. 2003. «Radical causes of cancer». *Nat Rev Cancer.* vol. 3, no 4, p. 276-285. En ligne. [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=12671666](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12671666) >.
- Imai, K., et A. Takaoka. 2006. «Comparing antibody and small-molecule therapies for cancer». *Nat Rev Cancer.* vol. 6, no 9, p. 714-727. En ligne. [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=16929325](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=16929325) >.
- Iwamoto, R., et E. Mekada. 2006. «ErbB and HB-EGF signaling in heart development and function». *Cell Struct Funct.* vol. 31, no 1, p. 1-14. En ligne. [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=16508205](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=16508205) >.
- Jain, R. K. 2005. «Antiangiogenic therapy for cancer: current and emerging concepts». *Oncology (Williston Park).* vol. 19, no 4 Suppl 3, p. 7-16. En ligne. [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=15934498](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15934498) >.
- Jeong, J. H., J. Y. An, Y. T. Kwon, L. Y. Li et Y. J. Lee. 2008. «Quercetin-induced ubiquitination and down-regulation of Her-2/neu». *J Cell Biochem.* En ligne. [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=18655187](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=18655187) >.
- Johnsson, A., C. H. Heldin, A. Wasteson, B. Westermark, T. F. Deuel, J. S. Huang, P. H. Seeburg, A. Gray, A. Ullrich, G. Scrace et al. 1984. «The c-sis gene encodes a precursor of the B chain of platelet-derived growth factor». *Embo J.* vol. 3, no 5, p. 921-928. En ligne. [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=6329745](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=6329745) >.
- Juge, N., R. F. Mithen et M. Traka. 2007. «Molecular basis for chemoprevention by sulforaphane: a comprehensive review». *Cell Mol Life Sci.* vol. 64, no 9, p. 1105-1127. En ligne. [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=17396224](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=17396224) >.

- Kakkar, T., M. Ma, Y. Zhuang, A. Patton, Z. Hu et B. Mounho. 2007. «Pharmacokinetics and safety of a fully human hepatocyte growth factor antibody, AMG 102, in cynomolgus monkeys». *Pharm Res.* vol. 24, no 10, p. 1910-1918. En ligne.  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=17520181](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=17520181) >.
- Kano, M. R., Y. Morishita, C. Iwata, S. Iwasaka, T. Watabe, Y. Ouchi, K. Miyazono et K. Miyazawa. 2005. «VEGF-A and FGF-2 synergistically promote neoangiogenesis through enhancement of endogenous PDGF-B-PDGFRbeta signaling». *J Cell Sci.* vol. 118, no Pt 16, p. 3759-3768. En ligne.  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=16105884](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=16105884) >.
- Kerbel, R. S. 2008. «Tumor angiogenesis». *N Engl J Med.* vol. 358, no 19, p. 2039-2049. En ligne.  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=18463380](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=18463380) >.
- Kerbel, R. S., et B. A. Kamen. 2004. «The anti-angiogenic basis of metronomic chemotherapy». *Nat Rev Cancer.* vol. 4, no 6, p. 423-436. En ligne.  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=15170445](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15170445) >.
- Kerkela, R., L. Grazette, R. Yacobi, C. Iliescu, R. Patten, C. Beahm, B. Walters, S. Shevtsov, S. Pesant, F. J. Clubb, A. Rosenzweig, R. N. Salomon, R. A. Van Etten, J. Alroy, J. B. Durand et T. Force. 2006. «Cardiotoxicity of the cancer therapeutic agent imatinib mesylate». *Nat Med.* vol. 12, no 8, p. 908-916. En ligne.  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=16862153](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=16862153) >.
- Kern, M., Z. Tjaden, Y. Ngiewih, N. Puppel, F. Will, H. Dietrich, G. Pahlke et D. Marko. 2005. «Inhibitors of the epidermal growth factor receptor in apple juice extract». *Mol Nutr Food Res.* vol. 49, no 4, p. 317-328. En ligne.  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=15759309](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15759309) >.
- Khan, N., F. Afaq, M. Saleem, N. Ahmad et H. Mukhtar. 2006. «Targeting multiple signaling pathways by green tea polyphenol (-)-epigallocatechin-3-gallate». *Cancer Res.* vol. 66, no 5, p. 2500-2505. En ligne.  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=16510563](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=16510563) >.
- Kieran, M. W., C. D. Turner, J. B. Rubin, S. N. Chi, M. A. Zimmerman, C. Chordas, G. Klement, A. Laforme, A. Gordon, A. Thomas, D. Neuberg, T. Browder et J. Folkman. 2005. «A feasibility trial of antiangiogenic (metronomic) chemotherapy in pediatric patients with recurrent or progressive cancer». *J Pediatr Hematol Oncol.*



vol. 27, no 11, p. 573-581. En ligne.

[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=16282886](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=16282886) >.

Kinoshta, M., N. McDannold, F. A. Jolesz et K. Hynynen. 2006. «Noninvasive localized delivery of Herceptin to the mouse brain by MRI-guided focused ultrasound-induced blood-brain barrier disruption». *Proc Natl Acad Sci U S A*. vol. 103, no 31, p. 11719-11723. En ligne.

[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=16868082](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=16868082) >.

Klein, C. B., et A. A. King. 2007. «Genistein genotoxicity: critical considerations of in vitro exposure dose». *Toxicol Appl Pharmacol*. vol. 224, no 1, p. 1-11. En ligne.

[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=17688899](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=17688899) >.

Knekt, P., J. Kumpulainen, R. Jarvinen, H. Rissanen, M. Heliovaara, A. Reunanen, T. Hakulinen et A. Aromaa. 2002. «Flavonoid intake and risk of chronic diseases». *Am J Clin Nutr*. vol. 76, no 3, p. 560-568. En ligne.

[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=12198000](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12198000) >.

Koch, A., A. Waha, J. C. Tonn, N. Sorensen, F. Berthold, M. Wolter, J. Reifemberger, W. Hartmann, W. Friedl, G. Reifemberger, O. D. Wiestler et T. Pietsch. 2001. «Somatic mutations of WNT/wingless signaling pathway components in primitive neuroectodermal tumors». *Int J Cancer*. vol. 93, no 3, p. 445-449. En ligne.

[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=11433413](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11433413) >.

Kojima-Yuasa, A., J. J. Hua, D. O. Kennedy et I. Matsui-Yuasa. 2003. «Green tea extract inhibits angiogenesis of human umbilical vein endothelial cells through reduction of expression of VEGF receptors». *Life Sci*. vol. 73, no 10, p. 1299-1313. En ligne.

[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=12850245](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12850245) >.

Korff, T., S. Kimmina, G. Martiny-Baron et H. G. Augustin. 2001. «Blood vessel maturation in a 3-dimensional spheroidal coculture model: direct contact with smooth muscle cells regulates endothelial cell quiescence and abrogates VEGF responsiveness». *Faseb J*. vol. 15, no 2, p. 447-457. En ligne.

[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=11156960](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11156960) >.

Labbé, D., M. Provencal, S. Lamy, D. Boivin, D. Gingras et R. Beliveau. 2008. «The flavonols quercetin, kaempferol and myricetin inhibit hepatocyte growth factor-induced medulloblastoma cell migration». *J Nutr*. (in press).

- Labrecque, L., S. Lamy, A. Chapus, S. Mihoubi, Y. Durocher, B. Cass, M. W. Bojanowski, D. Gingras et R. Beliveau. 2005. «Combined inhibition of PDGF and VEGF receptors by ellagic acid, a dietary-derived phenolic compound». *Carcinogenesis*. vol. 26, no 4, p. 821-826. En ligne.  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=15661805](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15661805) >.
- Laird, A. D., P. Vajkoczy, L. K. Shawver, A. Thurnher, C. Liang, M. Mohammadi, J. Schlessinger, A. Ullrich, S. R. Hubbard, R. A. Blake, T. A. Fong, L. M. Strawn, L. Sun, C. Tang, R. Hawtin, F. Tang, N. Shenoy, K. P. Hirth, G. McMahon et Cherrington. 2000. «SU6668 is a potent antiangiogenic and antitumor agent that induces regression of established tumors». *Cancer Res*. vol. 60, no 15, p. 4152-4160. En ligne.  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=10945623](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10945623) >.
- Lamy, S., E. Beaulieu, D. Labbé, V. Bedard, A. Moghrabi, S. Barrette, D. Gingras et R. Beliveau. 2008. «Delphinidin, a dietary anthocyanidin, inhibits platelet-derived growth factor ligand/receptor (PDGF/PDGFR) signaling». *Carcinogenesis*. vol. 29, no 5, p. 1033-1041. En ligne.  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=18339683](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=18339683) >.
- Lamy, S., M. Blanchette, J. Michaud-Levesque, R. Lafleur, Y. Durocher, A. Moghrabi, S. Barrette, D. Gingras et R. Beliveau. 2006. «Delphinidin, a dietary anthocyanidin, inhibits vascular endothelial growth factor receptor-2 phosphorylation». *Carcinogenesis*. vol. 27, no 5, p. 989-996. En ligne.  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=16308314](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=16308314) >.
- Lamy, S., D. Gingras et R. Beliveau. 2002. «Green tea catechins inhibit vascular endothelial growth factor receptor phosphorylation». *Cancer Res*. vol. 62, no 2, p. 381-385. En ligne.  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=11809684](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11809684) >.
- Lamy, S., R. Lafleur, V. Bedard, A. Moghrabi, S. Barrette, D. Gingras et R. Beliveau. 2007. «Anthocyanidins inhibit migration of glioblastoma cells: structure-activity relationship and involvement of the plasminolytic system». *J Cell Biochem*. vol. 100, no 1, p. 100-111. En ligne.

[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=16823770](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=16823770).

Landis, S. H., T. Murray, S. Bolden et P. A. Wingo. 1999. «Cancer statistics, 1999». *CA Cancer J Clin.* vol. 49, no 1, p. 8-31, 31. En ligne.  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=10200775](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10200775) >.

LaRochelle, W. J., M. Jeffers, W. F. McDonald, R. A. Chillakuru, N. A. Giese, N. A. Lokker, C. Sullivan, F. L. Boldog, M. Yang, C. Vernet, C. E. Burgess, E. Fernandes, L. L. Deegler, B. Rittman, J. Shimkets, R. A. Shimkets, J. M. Rothberg et H. S. Lichtenstein. 2001. «PDGF-D, a new protease-activated growth factor». *Nat Cell Biol.* vol. 3, no 5, p. 517-521. En ligne.  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=11331882](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11331882) >.

Lee, K. W., N. J. Kang, Y. S. Heo, E. A. Rogozin, A. Pugliese, M. K. Hwang, G. T. Bowden, A. M. Bode, H. J. Lee et Z. Dong. 2008. «Raf and MEK protein kinases are direct molecular targets for the chemopreventive effect of quercetin, a major flavonol in red wine». *Cancer Res.* vol. 68, no 3, p. 946-955. En ligne.  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=18245498](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=18245498).

Lee, W. J., W. K. Chen, C. J. Wang, W. L. Lin et T. H. Tseng. 2008. «Apigenin inhibits HGF-promoted invasive growth and metastasis involving blocking PI3K/Akt pathway and beta 4 integrin function in MDA-MB-231 breast cancer cells». *Toxicol Appl Pharmacol.* vol. 226, no 2, p. 178-191. En ligne.  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=17961621](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=17961621).

Lee, Wei-Jiunn, Lan-Feng Wu, Wen-Kang Chen, Chau-Jong Wang et Tsui-Hwa Tseng. 2006. «Inhibitory effect of luteolin on hepatocyte growth factor/scatter factor-induced HepG2 cell invasion involving both MAPK/ERKs and PI3K-Akt pathways». *Chemico-Biological Interactions.* vol. 160, no 2, p. 123-133. En ligne.  
<http://www.sciencedirect.com/science/article/B6T56-4J624RF-2/1/e5de9a0c9c92f5bfd9fd848cd1c94565>.

Legler, Julie M., Lynn A. Gloeckler Ries, Malcolm A. Smith, Joan L. Warren, Ellen F. Heineman, Richard S. Kaplan et Martha S. Linet. 1999. «Brain and Other Central Nervous System Cancers: Recent Trends in Incidence and Mortality». *J. Natl. Cancer Inst.* vol. 91, no 16, p. 1382-1390. En ligne.  
<http://jnci.oxfordjournals.org/cgi/content/abstract/jnci.91/16/1382>.

Li, M., Z. He, S. Ermakova, D. Zheng, F. Tang, Y. Y. Cho, F. Zhu, W. Y. Ma, Y. Sham, E. A. Rogozin, A. M. Bode, Y. Cao et Z. Dong. 2007. «Direct inhibition of insulin-like growth factor-I receptor kinase activity by (-)-epigallocatechin-3-gallate regulates

- cell transformation». *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* vol. 16, no 3, p. 598-605. En ligne.  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=17372258](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=17372258) >.
- Li, X., A. Ponten, K. Aase, L. Karlsson, A. Abramsson, M. Uutela, G. Backstrom, M. Hellstrom, H. Bostrom, H. Li, P. Soriano, C. Betsholtz, C. H. Heldin, K. Alitalo, A. Ostman et U. Eriksson. 2000. «PDGF-C is a new protease-activated ligand for the PDGF alpha-receptor». *Nat Cell Biol.* vol. 2, no 5, p. 302-309. En ligne.  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=10806482](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10806482) >.
- Li, Yunqing, Fadila Guessous, Elizabeth B. Johnson, Charles G. Eberhart, Xiao-Nan Li, Qing Shu, Shongshan Fan, Bachchu Lal, John Laterra, David Schiff et Roger Abounader. 2007. «Functional and molecular interactions between the HGF/c-Met pathway and c-Myc in large-cell medulloblastoma». *Lab Invest.* vol. 88, no 2, p. 98-111. En ligne.  
<http://dx.doi.org/10.1038/labinvest.3700702>.
- Li, Yunqing, Bachchu Lal, Sherwin Kwon, Xing Fan, Usha Saldanha, Thomas E. Reznik, Eric B. Kuchner, Charles Eberhart, John Laterra et Roger Abounader. 2005. «The Scatter Factor/Hepatocyte Growth Factor: c-Met Pathway in Human Embryonal Central Nervous System Tumor Malignancy». *Cancer Res.* vol. 65, no 20, p. 9355-9362. En ligne. <<http://cancerres.aacrjournals.org/cgi/content/abstract/65/20/9355>>.
- Liang, Y. C., S. Y. Lin-shiau, C. F. Chen et J. K. Lin. 1997. «Suppression of extracellular signals and cell proliferation through EGF receptor binding by (-)-epigallocatechin gallate in human A431 epidermoid carcinoma cells». *J Cell Biochem.* vol. 67, no 1, p. 55-65. En ligne.  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=9328839](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9328839) >.
- Lim, Y. C., H. Y. Park, H. S. Hwang, S. U. Kang, J. H. Pyun, M. H. Lee, E. C. Choi et C. H. Kim. 2008. «(-)-Epigallocatechin-3-gallate (EGCG) inhibits HGF-induced invasion and metastasis in hypopharyngeal carcinoma cells». *Cancer Lett.* vol. 271, no 1, p. 140-152. En ligne.  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=18632202](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=18632202).
- Longati, P., A. Bardelli, C. Ponzetto, L. Naldini et P. M. Comoglio. 1994. «Tyrosines1234-1235 are critical for activation of the tyrosine kinase encoded by the MET proto-oncogene (HGF receptor)». *Oncogene.* vol. 9, no 1, p. 49-57. En ligne.  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=8302603](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8302603).
- Machesky, L. M. 2008. «Lamellipodia and filopodia in metastasis and invasion». *FEBS Lett.* vol. 582, no 14, p. 2102-2111. En ligne.



[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=18396168](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=18396168)>.

Manach, C., A. Scalbert, C. Morand, C. Remesy et L. Jimenez. 2004. «Polyphenols: food sources and bioavailability». *Am J Clin Nutr.* vol. 79, no 5, p. 727-747. En ligne. [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=15113710](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15113710)>.

Manach, C., G. Williamson, C. Morand, A. Scalbert et C. Remesy. 2005. «Bioavailability and bioefficacy of polyphenols in humans. I. Review of 97 bioavailability studies». *Am J Clin Nutr.* vol. 81, no 1 Suppl, p. 230S-242S. En ligne. [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=15640486](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15640486)>.

Manning, Brendan D., et Lewis C. Cantley. 2007. «AKT/PKB Signaling: Navigating Downstream». *Cell.* vol. 129, no 7, p. 1261-1274. En ligne. <http://www.sciencedirect.com/science/article/B6WSN-4P2SJPT-B/1/f23f7cb4223e9c573eb522c8d9237903> >.

Marino, S. 2005. «Medulloblastoma: developmental mechanisms out of control». *Trends Mol Med.* vol. 11, no 1, p. 17-22. En ligne. [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=15649818](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15649818)>.

Maris, J. M., J. Courtright, P. J. Houghton, C. L. Morton, R. Gorlick, E. A. Kolb, R. Lock, M. Tajbakhsh, C. P. Reynolds, S. T. Keir, J. Wu et M. A. Smith. 2008. «Initial testing of the VEGFR inhibitor AZD2171 by the pediatric preclinical testing program». *Pediatr Blood Cancer.* vol. 50, no 3, p. 581-587. En ligne. [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=17457854](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=17457854) >.

Masamune, A., K. Kikuta, M. Satoh, N. Suzuki et T. Shimosegawa. 2005. «Green tea polyphenol epigallocatechin-3-gallate blocks PDGF-induced proliferation and migration of rat pancreatic stellate cells». *World J Gastroenterol.* vol. 11, no 22, p. 3368-3374. En ligne. [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=15948241](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15948241) >.

Masamune, A., M. Satoh, K. Kikuta, N. Suzuki, K. Satoh et T. Shimosegawa. 2005. «Ellagic acid blocks activation of pancreatic stellate cells». *Biochem Pharmacol.* vol. 70, no 6, p. 869-878. En ligne. [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=16023081](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=16023081) >.

Meiers, S., M. Kemeny, U. Weyand, R. Gastpar, E. von Angerer et D. Marko. 2001. «The anthocyanidins cyanidin and delphinidin are potent inhibitors of the epidermal



- growth-factor receptor». *J Agric Food Chem.* vol. 49, no 2, p. 958-962. En ligne.  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=11262056](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11262056) >.
- Middleton, Elliott, Jr., Chithan Kandaswami et Theoharis C. Theoharides. 2000. «The Effects of Plant Flavonoids on Mammalian Cells: Implications for Inflammation, Heart Disease, and Cancer». *Pharmacol Rev.* vol. 52, no 4, p. 673-751. En ligne.  
<http://pharmrev.aspetjournals.org/cgi/content/abstract/52/4/673> >.
- Migliore, Cristina, et Silvia Giordano. 2008. «Molecular cancer therapy: Can our expectation be MET?». *European Journal of Cancer.* vol. 44, no 5, p. 641-651. En ligne.  
<http://www.sciencedirect.com/science/article/B6T68-4S02D5D-1/1/3fd3e95599cbdd25da5770c01654f81> >.
- Mizrak, D., M. Brittan et M. R. Alison. 2008. «CD133: molecule of the moment». *J Pathol.* vol. 214, no 1, p. 3-9. En ligne.  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=18067118](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=18067118) >.
- Motzer, R. J., T. E. Hutson, P. Tomczak, M. D. Michaelson, R. M. Bukowski, O. Rixe, S. Oudard, S. Negrier, C. Szczylik, S. T. Kim, I. Chen, P. W. Bycott, C. M. Baum et R. A. Figlin. 2007. «Sunitinib versus interferon alfa in metastatic renal-cell carcinoma». *N Engl J Med.* vol. 356, no 2, p. 115-124. En ligne.  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=17215529](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=17215529) >.
- Motzer, R. J., M. D. Michaelson, B. G. Redman, G. R. Hudes, G. Wilding, R. A. Figlin, M. S. Ginsberg, S. T. Kim, C. M. Baum, S. E. DePrimo, J. Z. Li, C. L. Bello, C. P. Theuer, D. J. George et B. I. Rini. 2006. «Activity of SU11248, a multitargeted inhibitor of vascular endothelial growth factor receptor and platelet-derived growth factor receptor, in patients with metastatic renal cell carcinoma». *J Clin Oncol.* vol. 24, no 1, p. 16-24. En ligne.  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=16330672](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=16330672) >.
- Murakami, A., H. Ashida et J. Terao. 2008. «Multitargeted cancer prevention by quercetin». *Cancer Lett.* En ligne.  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=18467024](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=18467024) >.
- Nahta, R., D. Yu, M. C. Hung, G. N. Hortobagyi et F. J. Esteva. 2006. «Mechanisms of disease: understanding resistance to HER2-targeted therapy in human breast cancer». *Nat Clin Pract Oncol.* vol. 3, no 5, p. 269-280. En ligne.  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=16683005](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=16683005) >.

- Nakamura, T., T. Nishizawa, M. Hagiya, T. Seki, M. Shimonishi, A. Sugimura, K. Tashiro et S. Shimizu. 1989. «Molecular cloning and expression of human hepatocyte growth factor». *Nature*. vol. 342, no 6248, p. 440-443. En ligne.  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=2531289](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=2531289) >.
- Naumov, G. N., L. A. Akslen et J. Folkman. 2006. «Role of angiogenesis in human tumor dormancy: animal models of the angiogenic switch». *Cell Cycle*. vol. 5, no 16, p. 1779-1787. En ligne.  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=16931911](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=16931911) >.
- Nguyen, T. T., E. Tran, T. H. Nguyen, P. T. Do, T. H. Huynh et H. Huynh. 2004. «The role of activated MEK-ERK pathway in quercetin-induced growth inhibition and apoptosis in A549 lung cancer cells». *Carcinogenesis*. vol. 25, no 5, p. 647-659. En ligne.  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=14688022](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=14688022) >.
- Nichenametla, S. N., T. G. Taruscio, D. L. Barney et J. H. Exon. 2006. «A review of the effects and mechanisms of polyphenolics in cancer». *Crit Rev Food Sci Nutr*. vol. 46, no 2, p. 161-183. En ligne.  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=16431408](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=16431408) >.
- Nowell, P. C. 1976. «The clonal evolution of tumor cell populations». *Science*. vol. 194, no 4260, p. 23-28. En ligne.  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=959840](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=959840) >.
- Oefner, C., A. D'Arcy, F. K. Winkler, B. Eggimann et M. Hosang. 1992. «Crystal structure of human platelet-derived growth factor BB». *Embo J*. vol. 11, no 11, p. 3921-3926. En ligne.  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=1396586](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=1396586) >.
- Olsson, Anna-Karin, Anna Dimberg, Johan Kreuger et Lena Claesson-Welsh. 2006. «VEGF receptor signalling - in control of vascular function». *Nat Rev Mol Cell Biol*. vol. 7, no 5, p. 359-371. En ligne. <<http://dx.doi.org/10.1038/nrm1911>  
[http://www.nature.com/nrm/journal/v7/n5/supinfo/nrm1911\\_S1.html](http://www.nature.com/nrm/journal/v7/n5/supinfo/nrm1911_S1.html) >.
- Ozer, E., F. Sarialioglu, R. Cetingoz, N. Yuceer, H. Cakmakci, S. Ozkal, N. Olgun, K. Uysal, F. Corapcioglu et S. Canda. 2004. «Prognostic significance of anaplasia and angiogenesis in childhood medulloblastoma: a pediatric oncology group study». *Pathol Res Pract*. vol. 200, no 7-8, p. 501-509. En ligne.

[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=15462497](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15462497) >.

Paget, S. 1889. «The distribution of secondary growths in cancer of the breast». *Lancet*. vol. 1, p. 571-573.

Pardridge, W. M. 2002. «Drug and gene delivery to the brain: the vascular route». *Neuron*. vol. 36, no 4, p. 555-558. En ligne.  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=12441045](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12441045) >.

Parkinson, T. M., et J. P. Brown. 1981. «Metabolic fate of food colorants». *Annu Rev Nutr*. vol. 1, p. 175-205. En ligne.  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=6764715](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=6764715) >.

Passaniti, A., R. M. Taylor, R. Pili, Y. Guo, P. V. Long, J. A. Haney, R. R. Pauly, D. S. Grant et G. R. Martin. 1992. «A simple, quantitative method for assessing angiogenesis and antiangiogenic agents using reconstituted basement membrane, heparin, and fibroblast growth factor». *Lab Invest*. vol. 67, no 4, p. 519-528. En ligne.  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=1279270](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=1279270) >.

Petersen, I. 2007. «Antiangiogenesis, anti-VEGF(R) and outlook». *Recent Results Cancer Res*. vol. 176, p. 189-199. En ligne.  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=17607926](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=17607926) >.

Pianetti, Stefania, Shangqin Guo, Kathryn T. Kavanagh et Gail E. Sonenshein. 2002. «Green Tea Polyphenol Epigallocatechin-3 Gallate Inhibits Her-2/Neu Signaling, Proliferation, and Transformed Phenotype of Breast Cancer Cells». *Cancer Res*. vol. 62, no 3, p. 652-655. En ligne.  
<http://cancerres.aacrjournals.org/cgi/content/abstract/62/3/652> >.

Pilorget, A., V. Berthet, J. Luis, A. Moghrabi, B. Annabi et R. Beliveau. 2003. «Medulloblastoma cell invasion is inhibited by green tea (-)epigallocatechin-3-gallate». *J Cell Biochem*. vol. 90, no 4, p. 745-755. En ligne.  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=14587030](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=14587030) >.

Polkinghorn, W. R., et N. J. Tarbell. 2007. «Medulloblastoma: tumorigenesis, current clinical paradigm, and efforts to improve risk stratification». *Nat Clin Pract Oncol*. vol. 4, no 5, p. 295-304. En ligne.  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=17464337](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=17464337) >.



- Powell, R. J., J. Bhargava, M. D. Basson et B. E. Sumpio. 1998. «Coculture conditions alter endothelial modulation of TGF-beta 1 activation and smooth muscle growth morphology». *Am J Physiol.* vol. 274, no 2 Pt 2, p. H642-649. En ligne.  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=9486269](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9486269) >.
- Relf, M., S. LeJeune, P. A. Scott, S. Fox, K. Smith, R. Leek, A. Moghaddam, R. Whitehouse, R. Bicknell et A. L. Harris. 1997. «Expression of the angiogenic factors vascular endothelial cell growth factor, acidic and basic fibroblast growth factor, tumor growth factor beta-1, platelet-derived endothelial cell growth factor, placenta growth factor, and pleiotrophin in human primary breast cancer and its relation to angiogenesis». *Cancer Res.* vol. 57, no 5, p. 963-969. En ligne.  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=9041202](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9041202) >.
- Richardson, T. P., M. C. Peters, A. B. Ennett et D. J. Mooney. 2001. «Polymeric system for dual growth factor delivery». *Nat Biotechnol.* vol. 19, no 11, p. 1029-1034. En ligne.  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=11689847](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11689847) >.
- Rossi, A., V. Caracciolo, G. Russo, K. Reiss et A. Giordano. 2008. «Medulloblastoma: from molecular pathology to therapy». *Clin Cancer Res.* vol. 14, no 4, p. 971-976. En ligne.  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=18281528](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=18281528) >.
- Rothschild, B. M., D. Tanke, I. HersHKovitz et M. Schultz. 1998. «Mesozoic neoplasia: origins of haemangioma in the Jurassic age». *Lancet.* vol. 351, no 9119, p. 1862. En ligne.  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=9652678](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9652678) >.
- Rothschild, B. M., B. J. Witzke et I. HersHKovitz. 1999. «Metastatic cancer in the Jurassic». *Lancet.* vol. 354, no 9176, p. 398. En ligne.  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=10437878](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10437878) >.
- Roy, S., S. Khanna, H. M. Alessio, J. Vider, D. Bagchi, M. Bagchi et C. K. Sen. 2002. «Anti-angiogenic property of edible berries». *Free Radic Res.* vol. 36, no 9, p. 1023-1031. En ligne.  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=12448828](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12448828) >.
- Rubin, B. P., M. C. Heinrich et C. L. Corless. 2007. «Gastrointestinal stromal tumour». *Lancet.* vol. 369, no 9574, p. 1731-1741. En ligne.

- [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=17512858](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=17512858) >.
- Russo, G. L. 2007. «Ins and outs of dietary phytochemicals in cancer chemoprevention». *Biochem Pharmacol.* vol. 74, no 4, p. 533-544. En ligne.  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=17382300](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=17382300) >.
- Sachinidis, A., C. Seul, S. Seewald, H. Ahn, Y. Ko et H. Vetter. 2000. «Green tea compounds inhibit tyrosine phosphorylation of PDGF beta-receptor and transformation of A172 human glioblastoma». *FEBS Lett.* vol. 471, no 1, p. 51-55. En ligne.  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=10760511](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10760511) >.
- Safford, B., A. Dickens, N. Halleron, D. Briggs, P. Carthew et V. Baker. 2003. «A model to estimate the oestrogen receptor mediated effects from exposure to soy isoflavones in food». *Regul Toxicol Pharmacol.* vol. 38, no 2, p. 196-209. En ligne.  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=14550760](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=14550760) >.
- Sah, Jerome F., Sivaprakasam Balasubramanian, Richard L. Eckert et Ellen A. Rorke. 2004. «Epigallocatechin-3-gallate Inhibits Epidermal Growth Factor Receptor Signaling Pathway: EVIDENCE FOR DIRECT INHIBITION OF ERK1/2 AND AKT KINASES». *J. Biol. Chem.* vol. 279, no 13, p. 12755-12762. En ligne.  
<http://www.jbc.org/cgi/content/abstract/279/13/12755> >.
- Sakata, R., T. Ueno, T. Nakamura, M. Sakamoto, T. Torimura et M. Sata. 2004. «Green tea polyphenol epigallocatechin-3-gallate inhibits platelet-derived growth factor-induced proliferation of human hepatic stellate cell line LI90». *J Hepatol.* vol. 40, no 1, p. 52-59. En ligne.  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=14672614](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=14672614) >.
- Sandler, A., et R. Herbst. 2006. «Combining targeted agents: blocking the epidermal growth factor and vascular endothelial growth factor pathways». *Clin Cancer Res.* vol. 12, no 14 Pt 2, p. 4421s-4425s. En ligne.  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=16857821](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=16857821) >.
- Sawano, A., S. Iwai, Y. Sakurai, M. Ito, K. Shitara, T. Nakahata et M. Shibuya. 2001. «Flt-1, vascular endothelial growth factor receptor 1, is a novel cell surface marker for the lineage of monocyte-macrophages in humans». *Blood.* vol. 97, no 3, p. 785-791. En ligne.  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=11157498](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11157498) >.

- Scalbert, Augustin, et Gary Williamson. 2000. «Dietary Intake and Bioavailability of Polyphenols». *J. Nutr.* vol. 130, no 8, p. 2073S-2085. En ligne.  
<http://jn.nutrition.org/cgi/content/abstract/130/8/2073S>.
- Schechter, A. L., D. F. Stern, L. Vaidyanathan, S. J. Decker, J. A. Drebin, M. I. Greene et R. A. Weinberg. 1984. «The neu oncogene: an erb-B-related gene encoding a 185,000-Mr tumour antigen». *Nature*. vol. 312, no 5994, p. 513-516. En ligne.  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=6095109](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=6095109).
- Schlessinger, J. 2002. «Ligand-induced, receptor-mediated dimerization and activation of EGF receptor». *Cell*. vol. 110, no 6, p. 669-672. En ligne.  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=12297041](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12297041).
- Schlumberger, H. G., et B. H. Lucke. 1948. «Tumors of fishes, amphibians, and reptiles». *Cancer Res.* vol. 8, no 12, p. 657-753. En ligne.  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=18119893](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=18119893).
- Shibuya, K., R. Komaki, T. Shintani, S. Itasaka, A. Ryan, J. M. Jurgensmeier, L. Milas, K. Ang, R. S. Herbst et M. S. O'Reilly. 2007. «Targeted therapy against VEGFR and EGFR with ZD6474 enhances the therapeutic efficacy of irradiation in an orthotopic model of human non-small-cell lung cancer». *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* vol. 69, no 5, p. 1534-1543. En ligne.  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=17889445](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=17889445).
- Shibuya, M., et L. Claesson-Welsh. 2006. «Signal transduction by VEGF receptors in regulation of angiogenesis and lymphangiogenesis». *Exp Cell Res.* vol. 312, no 5, p. 549-560. En ligne.  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=16336962](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=16336962).
- Singh, S. K., I. D. Clarke, M. Terasaki, V. E. Bonn, C. Hawkins, J. Squire et P. B. Dirks. 2003. «Identification of a cancer stem cell in human brain tumors». *Cancer Res.* vol. 63, no 18, p. 5821-5828. En ligne.  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=14522905](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=14522905).
- Singh, S. K., C. Hawkins, I. D. Clarke, J. A. Squire, J. Bayani, T. Hide, R. M. Henkelman, M. D. Cusimano et P. B. Dirks. 2004. «Identification of human brain tumour initiating cells». *Nature*. vol. 432, no 7015, p. 396-401. En ligne.  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=15549107](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15549107).



- Slamon, D. J., B. Leyland-Jones, S. Shak, H. Fuchs, V. Paton, A. Bajamonde, T. Fleming, W. Eiermann, J. Wolter, M. Pegram, J. Baselga et L. Norton. 2001. «Use of chemotherapy plus a monoclonal antibody against HER2 for metastatic breast cancer that overexpresses HER2». *N Engl J Med*. vol. 344, no 11, p. 783-792. En ligne. [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=11248153](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11248153) >.
- Soldati, C., S. Biagioni, G. Poiana et G. Augusti-Tocco. 2008. «beta-Catenin and actin reorganization in HGF/SF response of ST14A cells». *J Neurosci Res*. vol. 86, no 5, p. 1044-1052. En ligne. [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=17975841](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=17975841) >.
- Spencer, J. P. 2008. «Flavonoids: modulators of brain function?». *Br J Nutr*. vol. 99 E Suppl 1, p. ES60-77. En ligne. [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=18503736](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=18503736) >.
- Spencer, J. P., C. Rice-Evans et R. J. Williams. 2003. «Modulation of pro-survival Akt/protein kinase B and ERK1/2 signaling cascades by quercetin and its in vivo metabolites underlie their action on neuronal viability». *J Biol Chem*. vol. 278, no 37, p. 34783-34793. En ligne. [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=12826665](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12826665) >.
- Steeg, P. S. 2006. «Tumor metastasis: mechanistic insights and clinical challenges». *Nat Med*. vol. 12, no 8, p. 895-904. En ligne. [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=16892035](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=16892035) >.
- Steeg, P. S., et D. Theodorescu. 2008. «Metastasis: a therapeutic target for cancer». *Nat Clin Pract Oncol*. vol. 5, no 4, p. 206-219. En ligne. [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=18253104](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=18253104) >.
- Stoclet, J. C., T. Chataigneau, M. Ndiaye, M. H. Oak, J. El Bedoui, M. Chataigneau et V. B. Schini-Kerth. 2004. «Vascular protection by dietary polyphenols». *Eur J Pharmacol*. vol. 500, no 1-3, p. 299-313. En ligne. [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=15464042](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15464042) >.
- Stoker, M., E. Gherardi, M. Perryman et J. Gray. 1987. «Scatter factor is a fibroblast-derived modulator of epithelial cell mobility». *Nature*. vol. 327, no 6119, p. 239-242. En ligne. [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=2952888](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=2952888) >.

- Stommel, J. M., A. C. Kimmelman, H. Ying, R. Nabioullin, A. H. Ponugoti, R. Wiedemeyer, A. H. Stegh, J. E. Bradner, K. L. Ligon, C. Brennan, L. Chin et R. A. DePinho. 2007. «Coactivation of receptor tyrosine kinases affects the response of tumor cells to targeted therapies». *Science*. vol. 318, no 5848, p. 287-290. En ligne.  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=17872411](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=17872411) >.
- Suganuma, M., S. Okabe, M. Oniyama, Y. Tada, H. Ito et H. Fujiki. 1998. «Wide distribution of [3H](-)-epigallocatechin gallate, a cancer preventive tea polyphenol, in mouse tissue». *Carcinogenesis*. vol. 19, no 10, p. 1771-1776. En ligne.  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=9806157](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9806157) >.
- Surh, Y. J. 2003. «Cancer chemoprevention with dietary phytochemicals». *Nat Rev Cancer*. vol. 3, no 10, p. 768-780. En ligne.  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=14570043](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=14570043) >.
- Tabernero, J. 2007. «The role of VEGF and EGFR inhibition: implications for combining anti-VEGF and anti-EGFR agents». *Mol Cancer Res*. vol. 5, no 3, p. 203-220. En ligne.  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=17374728](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=17374728) >.
- Talavera, S., C. Felgines, O. Texier, C. Besson, A. Gil-Izquierdo, J. L. Lamaison et C. Remesy. 2005. «Anthocyanin metabolism in rats and their distribution to digestive area, kidney, and brain». *J Agric Food Chem*. vol. 53, no 10, p. 3902-3908. En ligne.  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=15884815](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15884815) >.
- Trusolino, L., et P. M. Comoglio. 2002. «Scatter-factor and semaphorin receptors: cell signalling for invasive growth». *Nat Rev Cancer*. vol. 2, no 4, p. 289-300. En ligne.  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=12001990](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12001990) >.
- Uehara, Y., O. Minowa, C. Mori, K. Shiota, J. Kuno, T. Noda et N. Kitamura. 1995. «Placental defect and embryonic lethality in mice lacking hepatocyte growth factor/scatter factor». *Nature*. vol. 373, no 6516, p. 702-705. En ligne.  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=7854453](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=7854453) >.
- van Buul-Wortelboer, M. F., H. J. Brinkman, K. P. Dingemans, P. G. de Groot, W. G. van Aken et J. A. van Mourik. 1986. «Reconstitution of the vascular wall in vitro. A novel model to study interactions between endothelial and smooth muscle cells». *Exp Cell Res*. vol. 162, no 1, p. 151-158. En ligne.



[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=3940226](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=3940226) >.

Vlahos, C. J., W. F. Matter, K. Y. Hui et R. F. Brown. 1994. «A specific inhibitor of phosphatidylinositol 3-kinase, 2-(4-morpholinyl)-8-phenyl-4H-1-benzopyran-4-one (LY294002)». *J Biol Chem.* vol. 269, no 7, p. 5241-5248. En ligne.  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=8106507](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8106507).

Vlahovic, G., Z. N. Rabbani, J. E. Herndon, 2nd, M. W. Dewhirst et Z. Vujaskovic. 2006. «Treatment with Imatinib in NSCLC is associated with decrease of phosphorylated PDGFR-beta and VEGF expression, decrease in interstitial fluid pressure and improvement of oxygenation». *Br J Cancer.* vol. 95, no 8, p. 1013-1019. En ligne.  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=17003785](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=17003785) >.

Vogel, C. L., M. A. Cobleigh, D. Tripathy, J. C. Gutheil, L. N. Harris, L. Fehrenbacher, D. J. Slamon, M. Murphy, W. F. Novotny, M. Burchmore, S. Shak, S. J. Stewart et M. Press. 2002. «Efficacy and safety of trastuzumab as a single agent in first-line treatment of HER2-overexpressing metastatic breast cancer». *J Clin Oncol.* vol. 20, no 3, p. 719-726. En ligne.  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=11821453](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11821453) >.

von Tell, D., A. Armulik et C. Betsholtz. 2006. «Pericytes and vascular stability». *Exp Cell Res.* vol. 312, no 5, p. 623-629. En ligne.  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=16303125](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=16303125) >.

Walker, E. H., M. E. Pacold, O. Perisic, L. Stephens, P. T. Hawkins, M. P. Wymann et R. L. Williams. 2000. «Structural determinants of phosphoinositide 3-kinase inhibition by wortmannin, LY294002, quercetin, myricetin, and staurosporine». *Mol Cell.* vol. 6, no 4, p. 909-919. En ligne.  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=11090628](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11090628).

Wang, X., P. Le, C. Liang, J. Chan, D. Kiewlich, T. Miller, D. Harris, L. Sun, A. Rice, S. Vasile, R. A. Blake, A. R. Howlett, N. Patel, G. McMahon et K. E. Lipson. 2003. «Potent and selective inhibitors of the Met [hepatocyte growth factor/scatter factor (HGF/SF) receptor] tyrosine kinase block HGF/SF-induced tumor cell growth and invasion». *Mol Cancer Ther.* vol. 2, no 11, p. 1085-1092. En ligne.  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=14617781](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=14617781).

WCRF/AICR (2007). Food, Nutrition, Physical Activity and the Prevention of Cancer: a Global Perspective. Washington DC, World Cancer Research Fund/American

Institute for Cancer Food Research: 517 p En ligne.

<http://wcrf.org/research/fnatpoc.lasso>.

Weidner, K. M., N. Arakaki, G. Hartmann, J. Vandekerckhove, S. Weingart, H. Rieder, C. Fonatsch, H. Tsubouchi, T. Hishida, Y. Daikuhara et al. 1991. «Evidence for the identity of human scatter factor and human hepatocyte growth factor». *Proc Natl Acad Sci U S A*. vol. 88, no 16, p. 7001-7005. En ligne.

[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=1831266](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=1831266) >.

Weinberg, R. A. 2007. *The biology of cancer*: Garland Science, Taylor & Francis Group, New York.

Wiseman, H., K. Casey, E. A. Bowey, R. Duffy, M. Davies, I. R. Rowland, A. S. Lloyd, A. Murray, R. Thompson et D. B. Clarke. 2004. «Influence of 10 wk of soy consumption on plasma concentrations and excretion of isoflavonoids and on gut microflora metabolism in healthy adults». *Am J Clin Nutr*. vol. 80, no 3, p. 692-699. En ligne.

[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=15321810](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15321810) >.

Woolard, J., W. Y. Wang, H. S. Bevan, Y. Qiu, L. Morbidelli, R. O. Pritchard-Jones, T. G. Cui, M. Sugiono, E. Waine, R. Perrin, R. Foster, J. Digby-Bell, J. D. Shields, C. E. Whittles, R. E. Mushens, D. A. Gillatt, M. Ziche, S. J. Harper et D. O. Bates. 2004. «VEGF165b, an inhibitory vascular endothelial growth factor splice variant: mechanism of action, in vivo effect on angiogenesis and endogenous protein expression». *Cancer Res*. vol. 64, no 21, p. 7822-7835. En ligne.

[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=15520188](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15520188) >.

Yang, E. B., L. Wei, K. Zhang, Y. Z. Chen et W. N. Chen. 2006. «Tannic acid, a potent inhibitor of epidermal growth factor receptor tyrosine kinase». *J Biochem*. vol. 139, no 3, p. 495-502. En ligne.

[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=16567414](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=16567414) >.

Yarden, Y., et M. X. Sliwkowski. 2001. «Untangling the ErbB signalling network». *Nat Rev Mol Cell Biol*. vol. 2, no 2, p. 127-137. En ligne.

[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=11252954](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11252954) >.

Youdim, K. A., M. Z. Qaiser, D. J. Begley, C. A. Rice-Evans et N. J. Abbott. 2004. «Flavonoid permeability across an in situ model of the blood-brain barrier». *Free Radic Biol Med*. vol. 36, no 5, p. 592-604. En ligne.

[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=14980703](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=14980703) >.

- Yu, J., C. Ustach et H. R. Kim. 2003. «Platelet-derived growth factor signaling and human cancer». *J Biochem Mol Biol.* vol. 36, no 1, p. 49-59. En ligne.  
<[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=12542975](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12542975)>.
- Zhan, Y., S. Kim, Y. Izumi, Y. Izumiya, T. Nakao, H. Miyazaki et H. Iwao. 2003. «Role of JNK, p38, and ERK in platelet-derived growth factor-induced vascular proliferation, migration, and gene expression». *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* vol. 23, no 5, p. 795-801. En ligne.  
<[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=12637337](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12637337)>.
- Zwick, E., J. Bange et A. Ullrich. 2002. «Receptor tyrosine kinases as targets for anticancer drugs». *Trends Mol Med.* vol. 8, no 1, p. 17-23. En ligne.  
<[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=11796262](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11796262)>.

## APPENDICE A

### CONTRIBUTION DE L'AUTEUR DU MÉMOIRE

Mon apport à la réalisation du premier article de ce mémoire intitulé : « Delphinidin, a dietary anthocyanidin, inhibits platelet derived growth factor ligand/receptor (PDGF/PDGFR) signaling » publié dans *Carcinogenesis* (Lamy *et al.*, 2008), a été divers. J'ai mis au point les modèles de coculture de cellules endothéliales et de cellules musculaires lisses dans un système en trois dimensions axés sur la formation et la stabilisation du réseau de tubes similaire au réseau de capillaires normal. J'ai compilé, analysé et interprété les données issues de ces expérimentations. J'ai également effectué, compilé, analysé et interprété les essais de migration et de prolifération cellulaire sur les cellules musculaires lisses et les cellules cancéreuses du poumon avec l'extrait de baies riche en anthocyanes. Finalement, j'ai participé aux différentes discussions concernant le projet.

Mon apport à la réalisation du second article intitulé : « The flavonols quercetin, kaempferol and myricetin inhibit hepatocyte growth factor-induced medulloblastoma cell migration » soumis dans *The Journal of Nutrition* (Labbé *et al.*, 2008), a été total. J'ai effectué des tests préliminaires sur près de 60 différents nutraceutiques avant de découvrir l'excellent potentiel des flavonols. J'ai ensuite élaboré, effectué, compilé, analysé et interprété les diverses expériences. Finalement, j'ai monté les différentes figures, effectué la recherche bibliographique et rédigé l'intégralité du manuscrit en anglais.